

THESIS / THÈSE

MASTER EN BIOCHIMIE ET BIOLOGIE MOLÉCULAIRE ET CELLULAIRE

Étude des impacts de la dessiccation sur le rotifère bdelloïde *Adineta vaga* : dommages oxydatifs, dommages à l'ADN, fitness

Radelet, Maud

Award date:
2016

Awarding institution:
Université de Namur

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.



UNIVERSITE DE NAMUR

Faculté des Sciences

**Étude des impacts de la dessiccation sur le rotifère bdelloïde *Adineta vaga* :
dommages oxydatifs, dommages à l'ADN, fitness**

**Mémoire présenté pour l'obtention
du grade académique de master 120 en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire**

Maud RADELET

Janvier 2016

Étude des impacts de la dessiccation sur les rotifères bdelloïdes *Adineta vaga* : dommages oxydatifs, dommages à l'ADN et fitness

RADELET Maud

Résumé

La dessiccation ou anhydrobiose est un processus physiologique au cours duquel peu d'organismes sont capables de survivre. Au sein des métazoaires, seuls trois phylum sont capables de résister à la dessiccation à « n'importe quel stade de leur vie », dont les rotifères bdelloïdes. En plus d'être capable de survivre à la dessiccation, les bdelloïdes ont évolué en différentes espèces depuis au moins 40 millions d'années, alors même qu'ils sont asexués. Il semblerait dès lors que la dessiccation et ses impacts sur les organismes ait permis aux bdelloïdes d'évoluer tout en étant asexués. Ce mémoire avait pour but d'étudier les différents impacts de la dessiccation chez les bdelloïdes *A. vaga*.

Au cours de ce mémoire, nous avons donc tenté d'étudier l'évolution des dommages oxydatifs lors de la dessiccation ainsi que son lien éventuel avec la survie à la dessiccation. De plus, nous avons étudié les dommages à l'ADN ainsi que la réparation/reconstruction du génome au cours de la réhydratation, par la méthode *Pulse-Field Gel Electrophoresis* (PFGE). Ces expériences PFGE nous ont permis d'apprendre que les bdelloïdes *A. vaga* sont capables de réassembler des régions de leur génome selon un modèle de départ, qui semble être transmis de génération en génération. De plus, nos résultats suggèrent que l'ADN puisse ne pas être réparé entièrement après une dessiccation. En parallèle avec ces résultats, nous avons tenté d'observer une différence de réparation de l'ADN au sein des cellules somatiques et germinales, par la méthode TUNEL. Une autre partie de ce mémoire a consisté à étudier les impacts de la dessiccation sur le fitness d'individus *A. vaga* sénescents. Nous voulions voir si la dessiccation pouvait permettre de relancer le mécanisme de ponte chez des individus sénescents. Enfin, les résultats obtenus suggèrent que le sucre tréhalose pourrait jouer un rôle protecteur au niveau de l'ADN des bdelloïdes, ce qui permettrait d'évoquer un lien éventuel entre l'absence de tréhalose détectable et l'évolution du génome de ces organismes asexués.

Mémoire de master 120 en biochimie et biologie moléculaire et cellulaire

Janvier 2016

Promoteur: K. Van Doninck

Remerciements

Je remercie tout d'abord le Professeur Karine Van Doninck de m'avoir accueillie au sein de son laboratoire et de m'avoir permis d'évoluer dans une structure conviviale. Merci également pour ses conseils qui m'ont permis d'améliorer la rédaction de ce mémoire.

Un tout grand merci à Boris Hespeels, mon encadrant, qui m'a consacré beaucoup de temps pour m'apprendre et me conseiller dans le domaine des rotifères bdelloïdes, que ce soit au niveau théorique ou au niveau pratique. Merci également pour ses nombreuses corrections et ses encouragements tout au long de la rédaction de ce mémoire.

Je remercie également les techniciennes de laboratoire, Julie Virgo et Catherine Demazy, qui m'ont épaulée et conseillée dans les expériences réalisées. Un merci particulier à Julie pour son implication dans les cultures de bdelloïdes et pour les moments de soutien et de rires. Un merci particulier également à Catherine pour les nombreux passages au confocal et pour persister dans l'optimisation de l'expérience TUNEL.

Je voudrais également remercier Marc Llirós pour ses nombreux conseils concernant les manipulations et particulièrement pour la PFGE. Merci également pour sa bonne humeur et sa gentillesse tout au long de mon année de mémoire.

Merci aux techniciennes de laboratoire, Enora Flamion et Amélie Léonard, pour leur gentillesse et les services rendus.

Je remercie également les personnes de mon bureau, Matthieu Terwagne, Nicolas Debortoli, Alessandro Derzelle et Marie Cariou, pour leur bonne humeur, leurs conseils et leur soutien tout au long de cette année.

Enfin, merci à ma famille pour leur soutien et pour les déplacements vers l'université les week-ends.

Table des matières

1.	Introduction.....	7
1.1.	Historique et découverte des rotifères.....	7
1.2.	L'anhydrobiose.....	7
1.2.1.	Définition de l'anhydrobiose	7
1.2.2.	Les organismes anhydrobiotes	8
1.3.	Description générale des rotifères bdelloïdes	9
1.4.	Adaptations morphologiques au processus de dessiccation.....	9
1.5.	Les dommages causés par l'anhydrobiose.....	19
1.5.1.	La surproduction de ROS et ses conséquences	19
1.5.2.	Intégrité du génome suite à la dessiccation	21
1.6.	Mode de reproduction des rotifères bdelloïdes	12
1.6.1.	Asexualité ancienne et parthénogenèse.....	12
1.6.2.	Avantages et inconvénients de la parthénogenèse	25
1.7.	Description du génome des rotifères bdelloïdes (<i>A. vaga</i>).....	14
1.7.1.	Une structure génomique incompatible avec le processus de méiose classique	14
1.7.2.	Tétraploïdie dégénérée.....	15
1.7.3.	Le génome des bdelloïdes semble contenir un nombre élevé de transferts horizontaux (HGT)	15
1.8.	Lien entre le génome des bdelloïdes et le phénomène de dessiccation	16
1.9.	Lien entre dessiccation et résistance aux dommages oxydatifs	17
1.10.	Les mécanismes de résistance à l'anhydrobiose.....	18
1.10.1.	Les enzymes anti-oxydantes.....	19
1.10.2.	Les sucres non-réducteurs	19
1.11.	Conditions favorables à la résistance à l'anhydrobiose	20
1.12.	Cycle de vie des rotifères bdelloïdes	21
1.12.1.	Sleeping Beauty <i>versus</i> 'The Picture of Dorian Gray'.....	21
1.12.2.	Description générale des cycles de vie de différentes espèces	21
1.12.3.	Les impacts de la dessiccation sur le cycle de vie.....	22
2.	Matériel et méthodes.....	25
2.1.	Protocole général de dessiccation	25
2.2.	Extraction protéique	25
2.3.	Dosage protéique par la méthode Bradford	25

2.4.	OxiELISA.....	26
2.5.	OxyBlot.....	26
2.6.	Protocole du TUNEL	26
2.7.	Cycle de vie d' <i>A. vaga</i>	27
2.7.1.	Détermination de l'espérance de vie des bdelloïdes <i>A. vaga</i>	27
2.7.2.	Optimisation de la dessiccation sur des individus isolés	28
2.7.3.	Mise en dessiccation des individus sénescents : la ponte est-elle réactivée après une dessiccation ?	28
2.8.	Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE)	28
2.9.	Restriction enzymatique	29
3.	Résultats.....	30
3.1.	Étude des dommages oxydatifs chez des bdelloïdes <i>A. vaga</i> hydratés, desséchés et réhydratés	30
3.2.	Étude de l'intégrité génomique chez des individus <i>A. vaga</i> par la méthode PFGE	31
3.2.1.	Cinétique de réparation de l'ADN après une dessiccation ou une irradiation par protons chez des individus <i>A. vaga</i>	31
3.2.2.	Visualisation du réassemblage génomique au cours de la réparation d'ADN suite à une dessiccation ou une irradiation par protons chez des individus <i>A. vaga</i>	65
3.3.	Visualisation des cassures d'ADN chez des bdelloïdes <i>A. vaga</i> hydratés, desséchés et réhydratés par la méthode du TUNEL.....	35
3.3.1.	Validation de la méthode TUNEL chez les bdelloïdes <i>A. vaga</i>	35
3.3.2.	Dommages de l'ADN chez des bdelloïdes hydratés et desséchés	36
3.3.3.	Optimisation de la méthode TUNEL dans le but d'obtenir un marquage des individus homogène et d'assurer une perméabilisation adéquate	36
3.3.4.	Optimisation de la méthode TUNEL dans le but d'étudier la réparation de l'ADN chez les individus <i>A. vaga</i> desséchés.	37
3.3.5.	Visualisation de la réparation de l'ADN dans les cellules somatiques vs. germinales des bdelloïdes <i>A. vaga</i>	38
3.3.6.	Visualisation de l'évolution des cassures d'ADN avec le temps passé en dessiccation chez des individus <i>A. vaga</i>	38
3.4.	Étude du cycle de vie des bdelloïdes <i>A. vaga</i> et des impacts de la dessiccation sur le fitness des individus	39
3.4.1.	Élaboration du cycle de vie des bdelloïdes <i>A. vaga</i> en conditions de laboratoire ..	39
3.4.2.	Optimisation de la dessiccation sur 1 individu <i>A. vaga</i>	40
3.4.3.	Dessiccation sur 1 individu des bdelloïdes <i>A. vaga</i> du cycle de vie et suivi d'une éventuelle réactivation de la ponte	41

3.5.	Visualisation d'un éventuel effet protecteur du tréhalose au niveau de l'intégrité génomique des individus <i>A. vaga</i> au cours d'une dessiccation	42
4.	Discussions	85
4.1.	Étude des dommages oxydatifs chez des bdelloïdes <i>A. vaga</i> hydratés, desséchés et réhydratés	85
4.2.	Étude de l'intégrité génomique d' <i>A. vaga</i> lors de la dessiccation et de l'irradiation par protons	44
4.2.1.	Visualisation de la réparation de l'ADN.....	44
4.2.2.	Visualisation du réassemblage génomique au cours de la réparation de l'ADN ...	46
4.3.	Visualisation des cassures d'ADN chez des bdelloïdes <i>A. vaga</i> au cours de la dessiccation et de la réhydratation.....	48
4.4.	Étude du cycle de vie des bdelloïdes <i>A. vaga</i> et des impacts de la dessiccation sur le fitness des individus	49
4.4.1.	Cycle de vie des bdelloïdes <i>A. vaga</i> en conditions de laboratoire	49
4.4.2.	Dessiccation sur 1 individu (cycle de vie)	51
4.5.	Visualisation d'un éventuel effet protecteur du tréhalose au niveau de l'intégrité génomique des individus <i>A. vaga</i> au cours d'une dessiccation	52
5.	Perspectives.....	54
5.1.	Étude des dommages oxydatifs chez des bdelloïdes <i>A. vaga</i>	54
5.2.	Étude de l'intégrité génomique des individus <i>A. vaga</i> par la méthode PFGE	56
5.2.1.	Réparation de l'ADN au cours de la réhydratation	56
5.2.2.	Réassemblage du génome au cours de la réhydratation	57
5.3.	Visualisation des cassures d'ADN chez des bdelloïdes <i>A. vaga</i> par la méthode du TUNEL.....	58
5.4.	Impacts de la dessiccation sur le fitness des individus <i>A. vaga</i>	59
5.6.	Rôle(s) du protéasome lors de la dessiccation	60
6.	Conclusion.....	62
7.	Bibliographie.....	64

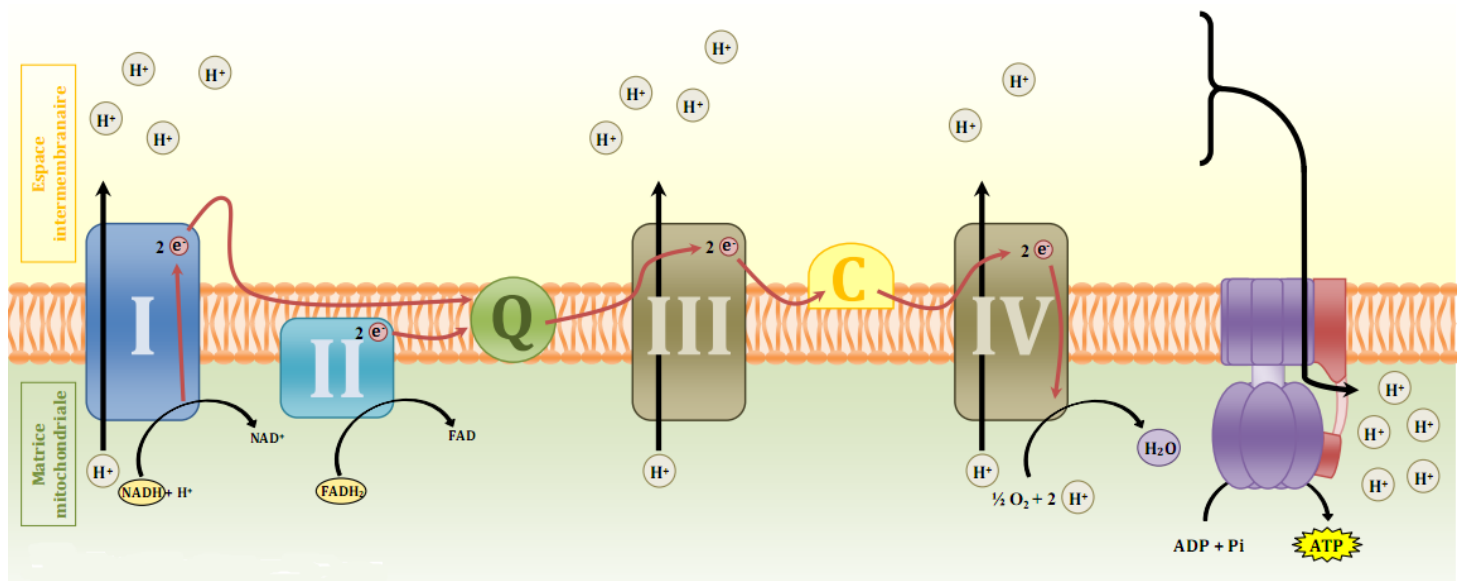


Figure 1 : Chaîne de transport des électrons (chaîne respiratoire) au niveau de la membrane interne des mitochondries Les électrons transmis par le NADH au complexe I transitent par le coenzyme Q, le complexe III et le cytochrome C pour aboutir au complexe IV, où les électrons sont captés par de l'oxygène et des protons pour former de l'eau. Les réactions d'oxydo-réduction catalysées par les complexes I, III et IV permettent le transport de protons de la matrice mitochondriale vers l'espace intermembranaire. Ces protons sont ensuite pompés vers la matrice mitochondriale par le complexe ATP-synthase pour former de l'ATP. En conditions normales, il peut y avoir des « fuites » d'électrons au niveau du complexe I, du coenzyme Q, du complexe III et du cytochrome C, ce qui sera responsable de la réduction partielle de molécules d'oxygène et entraînera ainsi la formation d'espèces réactives de l'oxygène (ROS). Simon, M, cours-pharmacie.com.

1. Introduction

1.1. Historique et découverte des rotifères

En 1677, Antony van Leeuwenhoek observait un phénomène étonnant : après avoir récolté de la poussière dans une gouttière et l'avoir placée dans un tube avec de l'eau, il observa de petits « animalcules » se déplacer dans le milieu suite au processus de réhydratation ¹. Cette expérience, reproductible, suscitait des questions puisque l'eau était reconnue comme « matrice de la vie »¹. Or, les prélèvements de van Leeuwenhoek étaient complètement asséchés. Les dessins réalisés par van Leeuwenhoek et insérés dans une lettre à l'attention d'Hendrick van Bleyswijk, en 1702, représentaient des petits organismes dont la tête était coiffée d'une couronne de cils. Les battements de ces cils évoquaient des roues en mouvement, ce qui amena l'italien Felice Fontana à nommer ces organismes « rotifero », ce mot dérivant du latin signifiant « wheel bearer »¹ (Fontana 1767) et se traduisant par « rotifères » en français.

1.2. L'anhydrobiose

Les rotifères bdelloïdes sont capables de survivre à des périodes prolongées de dessiccation ou d'anhydrobiose plusieurs fois au cours de leur vie. Dans ce mémoire, nous nous intéresserons à la compréhension de ce phénomène ainsi qu'à l'étude de ses impacts sur les bdelloïdes.

1.2.1. Définition de l'anhydrobiose

L'anhydrobiose est le processus lors duquel le métabolisme d'un organisme se retrouve à l'arrêt complet lorsque le corps est presque entièrement dépourvu de son contenu en molécules d'eau *via* une évaporation ^{2,3}. Dans ce mémoire, nous parlerons essentiellement d'anhydrobiose (ou de dessiccation) totale, à ne pas confondre avec la dessiccation partielle. Les scientifiques parlent d'état anhydrobiotique lorsqu'un organisme contient moins de 0,1 g d'eau/g de masse sèche, c'est-à-dire moins de 10 % d'eau dans le corps ³. Les molécules d'eau sont importantes pour permettre un bon fonctionnement du métabolisme. En effet, les protéines sont entourées d'une multitude de molécules d'eau (couche d'hydratation) qui leur permet de conserver une conformation native, c'est-à-dire la conformation dans laquelle une protéine est capable d'exercer sa fonction. Sans ces molécules d'eau, les interactions (forces de Van der Waals, ponts hydrogène, interactions hydrophobes...) agissant au sein des protéines sont déstabilisées et peuvent se briser, ce qui peut entraîner le dépliement des protéines et donc la perte de leur fonction ¹. Le métabolisme reposant sur le bon fonctionnement des protéines, la dessiccation entraîne une dysfonction voire une non-fonction des protéines qui entraîne à son tour un arrêt du métabolisme ^{2,4}. Un des points clé du mécanisme de résistance à la dessiccation est le fait de pouvoir relancer le métabolisme lors de la réhydratation. Cela pourrait se faire soit *via* la restauration de la conformation native des protéines ayant été dénaturées (dépliées), soit par la capacité de garder les protéines dans leur conformation native *via* des mécanismes empêchant leur dénaturation.

Les molécules d'eau sont également importantes pour le maintien de l'intégrité des membranes cellulaires. En effet, l'organisation des lipides qui les constituent varie selon la quantité en molécules d'eau dans la cellule ⁵. De plus, la dessiccation a également un impact négatif sur la chaîne de transport des électrons située au niveau de la membrane interne des mitochondries ⁶. En effet, la privation en eau ainsi que la dysfonction des protéines perturbent le bon fonctionnement de la chaîne de transport d'électrons, ce qui entraîne une augmentation de la production d'espèces réactives de l'oxygène (*Reactive Oxygen Species* : ROS, *Fig. 1*).

Ces dernières, lorsqu'elles sont présentes en trop grande concentration, sont nocives pour l'organisme puisqu'elles oxydent les protéines, les lipides et l'ADN, ce qui peut mener à la dénaturation de ces molécules ou à des mutations de l'ADN⁶. Enfin, la dessiccation est connue pour induire des cassures doubles brin au niveau de l'ADN (*DNA Double Strand Breaks* : DSBs) des organismes desséchés^{7,8}. La plupart des organismes qui subiraient une telle expérience se verraient mourir puisque les dommages causés aux cellules par la dessiccation totale sont très importants. Pourtant, quelques organismes sont capables de lutter contre la dessiccation et l'arrêt complet de leur métabolisme et de réparer les dommages lors de leur réveil (réhydratation). Ces organismes sont appelés « anhydrobiotes »¹.

1.2.2. Les organismes anhydrobiotes

Les organismes anhydrobiotes sont polyphylétiques puisqu'ils se retrouvent dans différents clades distincts. En effet, nous en retrouvons parmi les cyanobactéries⁹ ou encore chez d'autres bactéries comme la bactérie *Deinococcus radiodurans*¹⁰ également connue pour sa résistance aux radiations.

Le clade des plantes contient aussi quelques espèces capables d'anhydrobiose au sein des plantes inférieures, telles que certaines algues, les lichens ou encore des bryophytes (*Tortula ruralis*), mais aussi au sein des plantes supérieures, comme les « plantes de la résurrection » *Selaginella lepidophylla* et *Craterostigma plantagineum* appartenant aux angiospermes^{11,12}. Contrairement aux angiospermes, aucune espèce de plantes appartenant à la classe des gymnospermes ne possède cette capacité, probablement à cause de leur taille trop importante, qui augmenterait (surface plus grande) la perte d'eau par évaporation^{12,13}. Plus généralement, les graines et le pollen de plantes sont également capables d'anhydrobiose⁴.

Le clade animal (métazoaires), quant à lui, ne possède que trois phyla capables de survivre à la dessiccation à n'importe quel stade de leur vie : les tardigrades, certains nématodes (ex. *Aphelenchus avenae*) et les rotifères bdelloïdes¹. Cependant, une étude a montré que les jeunes œufs/embryons des bdelloïdes de l'espèce « *Adineta vaga* » avaient une résistance à la dessiccation plus faible que les embryons plus âgés¹⁴. De plus, il semblerait que les bdelloïdes ne soient pas tous capables de survivre à la dessiccation. En effet, une étude menée par C. Ricci a montré que trois espèces de bdelloïdes vivant en milieu aquatique (rarement soumis aux dessiccations) n'étaient pas capables de survivre à la dessiccation¹⁵. Cette observation ne s'applique pas à toutes les espèces de bdelloïdes vivant en milieu aquatique. Certains bdelloïdes sembleraient donc avoir perdu leur résistance à la dessiccation¹⁵.

D'autres métazoaires résistent à la dessiccation uniquement lorsqu'ils se trouvent dans un stade pouvant mener à un état de dormance, comme les larves d'insecte chironomidés *Polypedilum vanderplanki*, les cystes embryonnaires du crustacé *Artemia* et les « resting eggs » (œufs résistants aux conditions environnementales extrêmes) des rotifères monogononts et du crustacé *Daphnia* communément appelé « puce d'eau »¹.

Enfin, dans le clade des champignons, la levure *Saccharomyces cerevisiae* (par exemple) fait partie des organismes résistants à la dessiccation¹⁶.

Le processus d'entrée en dessiccation et la survie des anhydrobiotes impliquent la mise en place d'adaptations morphologiques et comportementales. Afin de comprendre ces adaptations morphologiques chez les bdelloïdes, nous allons tout d'abord décrire la structure générale de ces organismes.

1.3. Description générale des rotifères bdelloïdes

Le phylum des rotifères se divise en différentes classes : les « *Monogononta* » (monogonontes), les « *Bdelloidea* » (bdelloïdes), les « *Seisonacea* » (seisonides) et les « *Acanthocephala* » (acanthocéphales) ^{17,18}.

Ce mémoire se focalisera sur l'étude des rotifères bdelloïdes caractérisés par une asexualité ancienne et une résistance au processus de dessiccation aux différents stades de vie de l'organisme.

Le terme « bdelloïde » dérive du grec ancien « βδελλα », qui signifie « sangsue », et le suffixe « oïde » signifie « comme » (en anglais : leech-like), ce qui décrit la façon dont certains bdelloïdes se déplacent ¹⁹.

Les rotifères bdelloïdes sont des métazoaires pseudocoelomates, mesurant de 100 à 1500 µM ¹⁹. Ils sont semi-aquatiques, puisqu'ils vivent dans des milieux aqueux pouvant être soumis à la dessiccation, c'est-à-dire à l'évaporation de l'eau. Ainsi, les bdelloïdes sont associés aux milieux limno-terrestriels comme les mousses et les lichens (Donner, 1965, ²⁰). Le corps du rotifère bdelloïde est composé de trois parties : la tête, le tronc et le pied (**Fig. 2 et 3**). La tête, qui porte la couronne de cils rotateurs, est rétractable dans le corps, tout comme le pied. Les cils rotateurs permettent de créer un courant qui amène les particules de nourriture jusque dans la bouche du rotifère, puis dans le pharynx modifié en « mastax », un organe masticateur. Le tronc contient le système digestif, les néphridies et les gonades présentes sous forme de paire, chaque gonade se trouvant de part et d'autre de l'intestin ¹⁹. Le pied contient des glandes pédieuses qui sécrètent une substance permettant aux rotifères d'adhérer à son substrat ¹⁹.

1.4. Adaptations morphologiques au processus de dessiccation

L'anhydrobiose comprend deux phases : une phase d'entrée en anhydrobiose où le rotifère bdelloïde est dit « contracté hydraté » et une phase d'anhydrobiose totale où le bdelloïde est dit « contracté desséché » ²¹ (**Fig. 4**). En conditions normales, liquide, les rotifères bdelloïdes ont une forme allongée (**Fig. 4a-c**) et se déplacent par des mouvements dits « leech-like ». Lorsqu'ils sont soumis à un stress quelconque (déshydratation, congélation, anoxie, UV, famine...) mais qu'il y a encore suffisamment d'eau dans leur milieu, ils se rétractent sur eux-mêmes et adoptent une conformation en « tun ». Ce « tun » est donc observé lorsque les individus sont encore hydratés et constitue un mécanisme de défense/protection (**Fig. 4d-f**). Cette morphologie est obtenue par contraction des muscles longitudinaux entraînant une rétraction de la tête et du pied à l'intérieur du tronc ²². Les tardigrades adoptent le même mécanisme alors que les nématodes s'enroulent sur eux-mêmes et prennent une forme de spirale ^{23,24}.

Lors de la dessiccation, le corps des bdelloïdes « s'aplati dorso-ventralement ce qui lui donne une apparence de dôme » ²⁵ (**Fig. 4g-i**). De plus, les organes internes, qui avaient commencé à se compacter durant la phase de préparation à l'anhydrobiose, se compactent encore plus afin de réduire au maximum le volume corporel de l'organisme anhydrobiote ²⁵.

Le fait de se replier sur soi-même permet de limiter la surface d'évaporation de l'eau et donc de diminuer la vitesse d'évaporation de l'eau ²⁶. Cette maîtrise de la perte d'eau est nécessaire pour permettre aux organes internes de ces organismes de se compacter correctement entre eux, de façon à réduire les dommages aux cellules et à faciliter la réhydratation ultérieure ^{22,27}.

La capacité de résister à la dessiccation totale serait restreinte aux organismes pouvant se compacter fortement et donc ne possédant pas de squelette rigide. De plus, il semblerait qu'une taille de quelques millimètres tout au plus soit favorable afin de réduire la surface d'évaporation

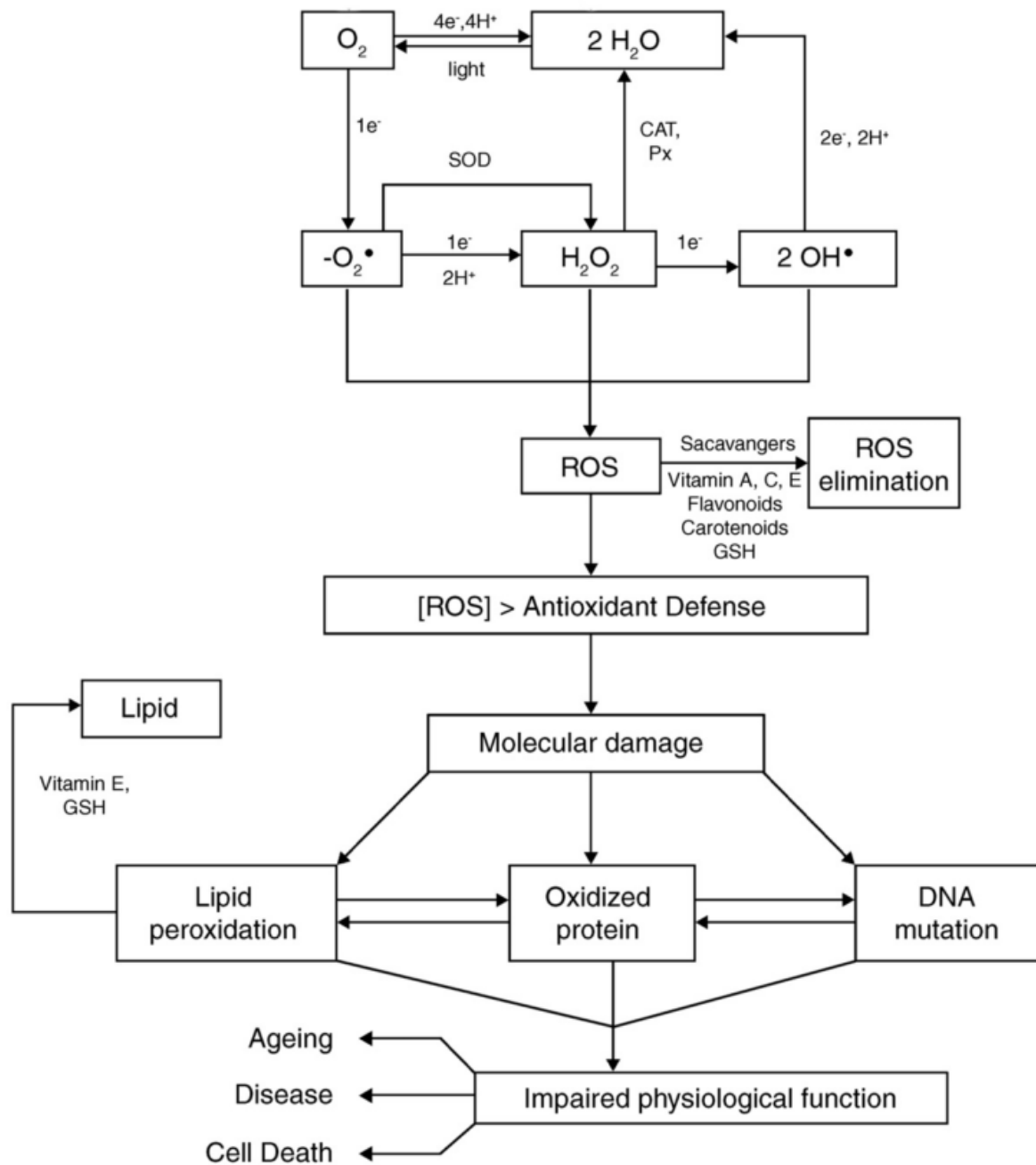


Figure 5 : Production des ROS et dommages aux cellules. França *et al.*, 2007.

de l'eau, bien que la larve de *P. vanderplanki*, dépassant les quelques millimètres, soit l'organisme le plus gros étant capable de survivre à la dessiccation totale.

Enfin, il a été observé, chez les bdelloïdes *A. vaga* du laboratoire, une agrégation des individus lors de la dessiccation⁸. Les individus se collent les uns aux autres, ce qui permet encore une fois de réduire la surface d'évaporation de ces organismes. Ce phénomène d'agrégation a aussi été observé chez les nématodes et chez les tardigrades^{28,29}.

Il est important pour la suite de ce mémoire de bien comprendre à quel point le bon repliement des organismes est important pour assurer une bonne survie après dessiccation.

1.5. Les dommages causés par l'anhydrobiose

Dans ce mémoire, nous nous intéresserons à l'étude des dommages causés lors de la dessiccation chez les bdelloïdes. Ainsi, nous allons étudier les dommages oxydatifs liés aux ROS ainsi que les dommages (DSBs) à l'ADN. Notre travail se focalisera sur l'évolution de ces dommages au cours du processus de dessiccation, ainsi que leurs impacts sur la survie des bdelloïdes.

1.5.1. La surproduction de ROS et ses conséquences

En temps normal, la chaîne respiratoire (ou chaîne de transport d'électrons, *Fig. 1*) de la mitochondrie oxyde partiellement (gain d'1 électron) 1 à 2 % de l'oxygène, ce qui mène à la formation d'anion superoxyde ($O_2^{\cdot-}$), celui-ci pouvant être transformé en peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) et en radical hydroxyle (OH^{\cdot}). Ces trois types de molécules sont appelées « *Reactive Oxygen Species* » (ROS) ou espèces réactionnelles de l'oxygène³⁰ (*Fig. 5*).

Les ROS sont connus pour induire des dommages très nocifs chez les organismes. Ainsi, le radical hydroxyle peut causer de graves dommages à la cellule, en altérant des macromolécules par peroxydation lipidique (membranes), carbonylation protéique, perte de groupe sulfhydryle³¹ ou mutations de l'ADN⁴. L'anion superoxyde, quant à lui, « réagit surtout avec les groupes prosthétiques Fe-S de certaines protéines », entraînant la libération de Fe^{2+} . Ce dernier réagit avec l' H_2O_2 pour former du Fe^{3+} , un groupement hydroxyle OH^- et le radical OH^{\cdot} via la « réaction de Fenton »³². Enfin, les radicaux OH^{\cdot} peuvent induire des cassures simple brin de l'ADN (*DNA Single Strand Breaks*, SSBs) dont la densité augmente tellement avec l'augmentation des doses de radiations ou du temps passé en dessiccation que les « SSBs » deviennent des cassures double brin de l'ADN (*DNA Double Strand Breaks*, DSBs)³². C'est pour combattre tous ces dommages que les cellules possèdent un arsenal d'enzymes antioxydantes dont le rôle est d'éliminer les radicaux libres de l'oxygène³⁰.

En situation normale (pas de stress), les antioxydants sont capables de prendre en charge la détoxification de ces molécules. Cependant, lorsque la cellule subit un événement stressant (UV, radiations, dessiccation...), la quantité de ROS devient telle que les antioxydants ne sont plus capables de tous les neutraliser (*Fig. 5*). Lors de la dessiccation, la quasi-totale absence d'eau et l'arrêt du métabolisme entraînent une inactivité des différents types de transport cellulaire ainsi qu'une augmentation de la concentration en macromolécules, ce qui altère le pH cytoplasmique (Senaratna et McKersie, 1986,³⁰). Cela pourrait altérer le bon fonctionnement de la chaîne respiratoire et ainsi favoriser la réduction partielle de l'oxygène au dépit de sa réduction totale.

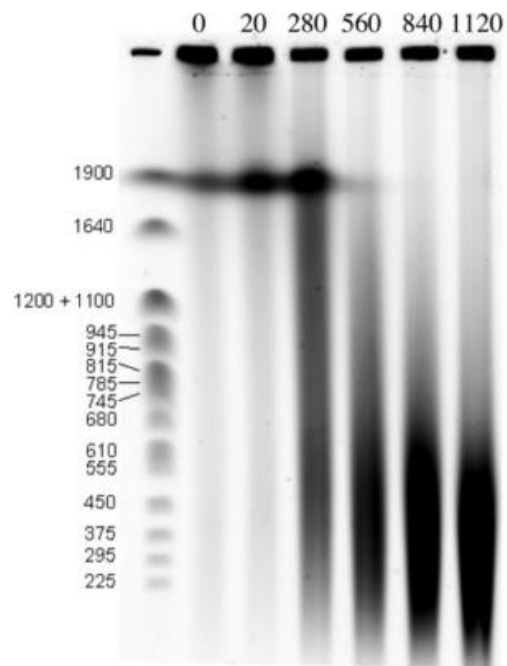


Figure 6 : Visualisation des DSBs de l'ADN (intégrité génomique), induites par rayonnements γ (Gray) chez des bdelloïdes *A. vaga*, par la méthode PFGE. L'étalon de poids moléculaire a été réalisé avec des chromosomes de levure. Gladyshev et Meselson, 2008.

1.5.2. Intégrité du génome suite à la dessiccation

En plus des ROS, il semblerait que la dessiccation induise des cassures double brins de l'ADN (*DNA Double Strand Breaks* : DSBs), comme Mattimore et Batista l'ont démontré chez *D. radiodurans*, une bactérie radio-résistante (et donc résistante aux cassures d'ADN générées par des radiations)¹⁰. Ces chercheurs ont postulé qu'il était peu probable que cette tolérance aux dommages de l'ADN puisse être une adaptation aux radiations ionisantes¹⁰. En effet, aucun organisme vivant sur Terre ne rencontre de radiations ionisantes en doses élevées dans son environnement naturel, et il n'y a donc aucun avantage sélectif à être radio-résistant. La radio-résistance serait donc une conséquence d'une adaptation à un autre phénomène naturel, plus fréquemment rencontré dans l'environnement, qui est la dessiccation ou anhydrobiose¹⁰. Mattimore et Batista ont confirmé cette hypothèse en produisant des bactéries *D. radiodurans* mutantes radio-sensibles incapables de réparer leur ADN endommagé. Ils ont montré que ces bactéries mutantes étaient également sensibles à la dessiccation, ce qui signifie que la capacité à réparer l'ADN est un avantage sélectif ayant permis aux organismes anhydrobiotes de survivre dans des environnements instables soumis à la dessiccation¹⁰. Il semble donc y avoir un lien étroit entre la radiation et la dessiccation, notamment la formation de cassures double brins de l'ADN. Ce lien est renforcé par le fait que les deux mécanismes (radiations gamma et dessiccation) impliquent également la formation de ROS^{7,30}.

Gladyshev et Meselson (2008) ont montré une chute rapide de la fertilité et de la fécondité chez des organismes sensibles aux radiations et à la dessiccation (rotifères monogonontes), après une exposition à des rayons gamma (< 200 Gy)⁷. La même expérience chez des rotifères bdelloïdes (résistants aux radiations et à la dessiccation) a montré qu'il faut appliquer une dose de rayons gamma cinq fois supérieure (jusque 800 Gy) pour obtenir une chute de fertilité et de fécondité chez les bdelloïdes, ce qui suppose la présence d'un système de protection antioxydant. Le fait d'être résistant à la dessiccation semble donc apporter une certaine résistance aux radiations⁷.

Les radiations altèrent le génome des cellules irradiées, ce qui mène à une diminution de la survie cellulaire. Cela peut résulter en la mort cellulaire étant donné que ces dommages à l'ADN peuvent être nocifs pour l'organisme³². Comme les radiations ionisantes agissent avec la même efficacité chez tous les organismes, elles induisent également la même quantité de DSBs par Méga paire de base (Mbp) du génome (approx. 0,005 DSB/Mbase/Gy d'irradiation)^{7,33}. Le seul moyen pour un organisme de faire face à une accumulation de DSBs au sein de son génome serait de réparer son ADN³³.

Des expériences réalisées par Gladyshev et Meselson (2008)⁷ chez des rotifères bdelloïdes *A. vaga* et *P. roseola* hydratés utilisant la méthode « *Pulsed-Field Gel Electrophoresis* (PFGE) » ont montré qu'une irradiation par rayons gamma (source de ¹³⁷Cs, 0 Gy à 1120 Gy) induit une accumulation progressive de DSBs au niveau de l'ADN des bdelloïdes au fur et à mesure que la quantité de radiations augmente sans diminuer fortement la survie ou la fécondation (**Fig. 6**)⁷.

Hespeels *et al.* (2014), quant à eux, ont voulu voir (1) si la dessiccation induit aussi des DSBs chez les bdelloïdes et (2) s'il est possible pour les bdelloïdes de survivre à la dessiccation lorsque tout leur génome est cassé. Pour cela, ils ont (1) soumis les bdelloïdes *A. vaga* à une cinétique de dessiccation (1J à 84J) et (2) ils ont irradié des bdelloïdes *A. vaga* deséchés 1J avec des doses croissantes de protons (0 Gy à 800 Gy). Les résultats montrent que la dessiccation et les radiations par protons induisent bien des DSBs chez les bdelloïdes et que la quantité de DSBs est directement proportionnelle au temps passé en dessiccation ainsi qu'aux

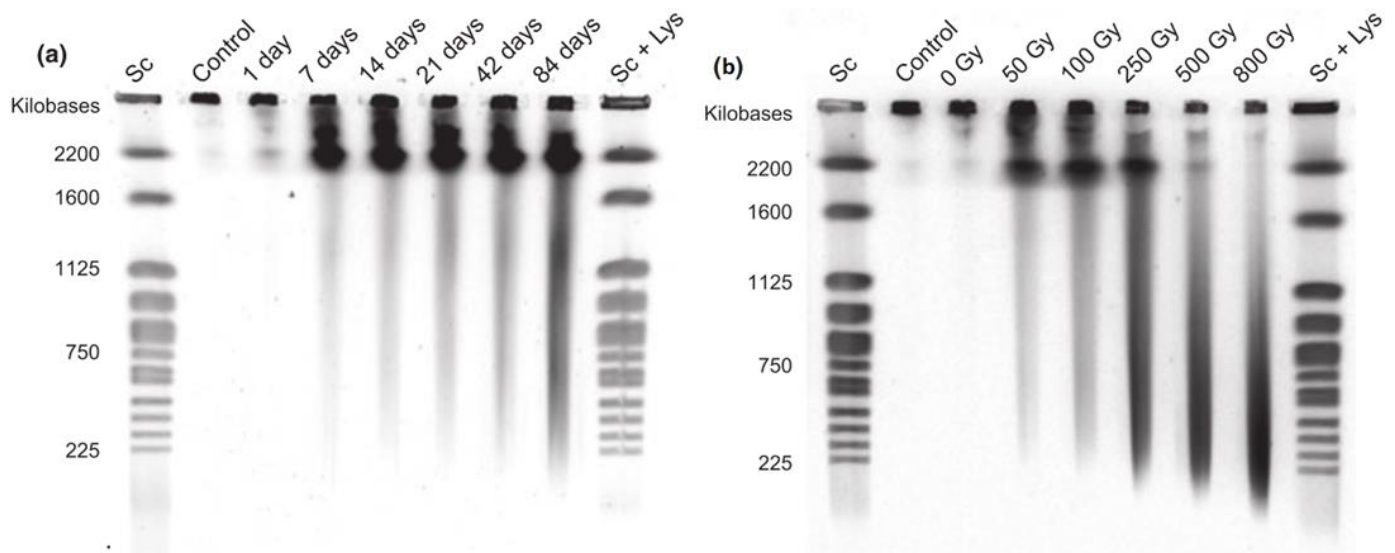


Figure 7 : Visualisation de l'intégrité génomique et des DSBs chez des bdelloïdes *A. vago* par la méthode PFGE. (a) : individus *A. vago* soumis à une cinétique de dessiccation (1J, 7J, 14J, 21J, 42J, 84J). (b) : individus *A. vago* soumis à des doses croissantes de radiations (0Gy, 50Gy, 100Gy, 250Gy, 500Gy et 800Gy). Les étalons de poids moléculaire ont été réalisés avec des chromosomes de *S. cerevisiae*. Chaque puits contient environ 1000 individus desséchés de 1 à 84 jours. Un contrôle a été réalisé avec des bdelloïdes hydratés. Le but de cette expérience était d'observer l'évolution de l'intégrité génomique au cours de la dessiccation. Hespeels *et al.*, 2014.

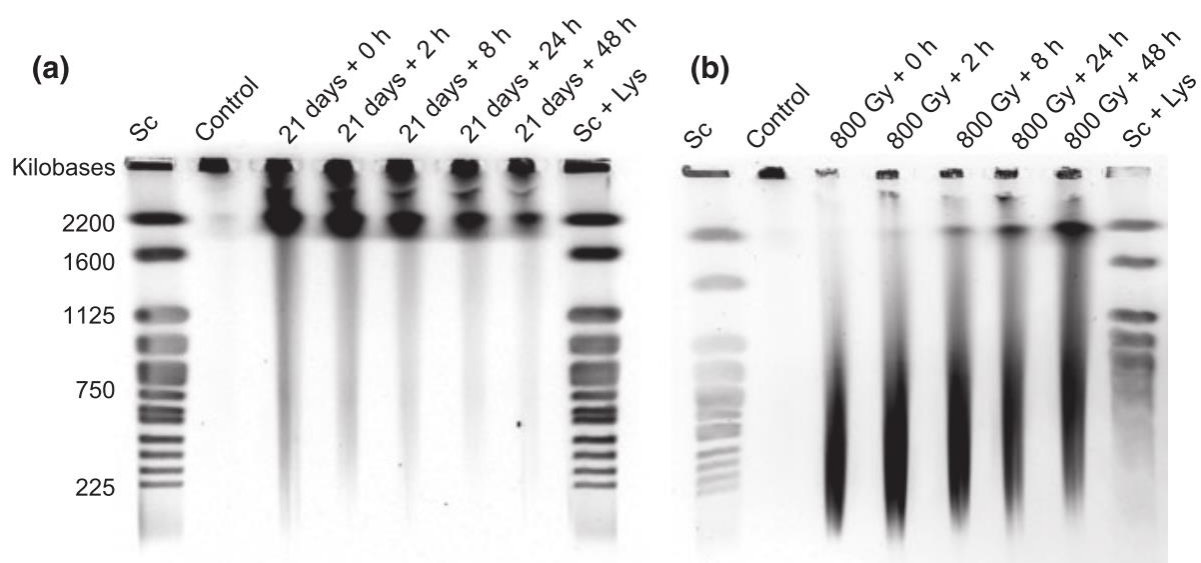


Figure 8 : Visualisation de l'intégrité génomique lors d'une cinétique de réparation après une dessiccation et une irradiation par protons. Hespeels *et al.*, 2014. Les étalons de poids moléculaire ont été réalisés avec des chromosomes de *S. cerevisiae*. Chaque puits contient environ 1000 individus desséchés. (a) : bdelloïdes *A. vago* desséchés 21 jours et réhydratés de 0 à 48h ; (b) : bdelloïdes *A. vago* desséchés 1 jour et exposés à 800 Gy de radiations par protons et réhydratés de 0 à 48h. Hespeels *et al.*, 2014.

doses de radiations (**Fig. 7a et 7b**). Concernant la survie, les résultats montrent que l'accumulation de DSBs dans le génome des bdelloïdes n'entraîne pas une diminution de la survie, ce qui signifie que ces organismes sont capables de survivre en ayant un génome fragmenté. De plus, malgré une différence de protocole d'irradiation, ces résultats concordent avec l'expérience de Gladyshev et Meselson (2008). En effet, Gladyshev et Meselson ont irradié (rayonnements gamma) des bdelloïdes hydratés, ce qui a induit la formation de ROS qui ont généré des DSBs au niveau de l'ADN³⁴. Hespeels *et al.*, quant à eux, ont irradié (protons) des bdelloïdes desséchés 1J, ce qui signifie qu'il n'y a pas eu de formation de ROS mais que ce sont les protons qui ont directement généré des DSBs au niveau de l'ADN⁸. Néanmoins, la réalisation des deux protocoles d'irradiation montre qu'une irradiation (de 100 à 800 Gy) induit des DSBs au niveau de l'ADN des rotifères bdelloïdes, dont la quantité semble proportionnelle à la quantité de radiations⁸.

Hespeels *et al.* (2014) ont également montré que lors de la réhydratation, le taux de DSBs diminue progressivement avec le temps puisqu'on voit apparaître sur le gel des fragments de plus en plus grands (diminution du smear, **Fig. 8**). De plus, au dernier temps de réhydratation testé (48h), des fragments d'ADN sont toujours visibles, ce qui signifie que l'ADN n'a pas (encore) été entièrement réparé après 48h et donc que son intégrité n'est toujours pas similaire à celle de l'ADN des bdelloïdes « contrôle hydraté » (**Fig. 8**). Cela démontre néanmoins que les bdelloïdes réparent leur ADN fragmenté.

Un des buts de ce mémoire sera d'étudier plus en profondeur l'intégrité du génome d'A. vago lors de la dessiccation/radiations par protons, et lors de la réhydratation. Cela sera plus amplement décrit dans le point 1.7.

1.6. Mode de reproduction des rotifères bdelloïdes

1.6.1. Asexualité ancienne et parthénogenèse

Les rotifères bdelloïdes intriguent les scientifiques depuis leur découverte. En effet, chez ces organismes, aucun mâle ou hermaphrodite n'a été observé jusqu'à présent. Seules des femelles sont observées, avec leur unique paire d'ovaires³⁵. Ces femelles semblent se reproduire par parthénogenèse thélytoque apomictique^{36,37}. Cela signifie que l'embryon se développe à partir d'un ovule non fécondé, que l'ovule a été formé sans méiose et que les ovules se développent toujours en individus femelles. De ce fait, chaque embryon femelle devrait hériter du génome complet de sa mère et ce mode de reproduction est considéré comme clonal. Le génome des filles peut cependant acquérir des mutations et différer du génome de leur mère, dans le long terme la différenciation entre individus va augmenter au sein de la lignée clonale³⁶. De plus, nous verrons que le génome des bdelloïdes a pu intégrer des gènes étrangers par « transfert horizontal de gènes » (*Horizontal Gene Transfert* : HGT), ce qui peut apporter une variabilité au niveau génique entre les individus issus d'une reproduction de type clonale.

Par ailleurs, notre laboratoire est actuellement en train d'étudier les échanges inter- et intra-géniques entre rotifères bdelloïdes qui peuvent apporter une diversité génique au sein des populations (cf. Debortoli *et al*, in press).

En l'absence de mâle, les scientifiques ont émis l'hypothèse que les rotifères bdelloïdes étaient des organismes asexués obligatoires³⁵. D'autres rotifères, comme les monogononts, sont capables de se reproduire de façon sexuée ou asexuée en fonction des conditions environnementales³⁸⁻⁴¹. En effet, en temps normal, les monogononts se reproduisent par parthénogenèse pour donner des femelles dites « amictiques », c'est-à-dire des femelles se reproduisant également par parthénogenèse pour ne donner que des femelles. Lorsque les conditions environnementales changent et sont moins favorables, telle qu'une densité élevée

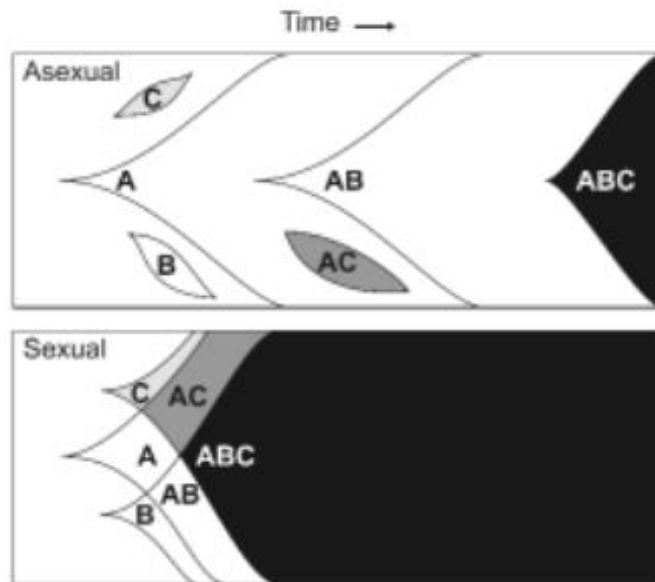


Figure 9 : Dans une population d'organismes asexués, ces derniers ne se reproduisent pas entre eux et ne peuvent donc pas s'échanger du matériel génétique. De ce fait, si le génome de départ contient la mutation A, alors l'ensemble de mutations A, B et C ne pourra être acquis que suite à l'accumulation successive de ces mutations (processus long) au sein du génome d'un même individu. Par contre, les organismes sexués se reproduisent entre eux et s'échangent donc du matériel génétique. Les processus de recombinaisons pourront donc amener plus rapidement un individu à posséder des mutations A, B et C au sein de son génome. Van Doninck *et al.*, 2003 (d'après Maynard Smith, 1998).

(perception d'un signal chimique dans le milieu : *quorum sensing* ⁴²), les monogononts se reproduisent temporairement de manière sexuée et produisent alors des femelles « mictiques » qui produisent soit des œufs haploïdes en cas de non fertilisation, soit des œufs diploïdes en cas de fertilisation. Ces œufs haploïdes se développent en mâles et les œufs diploïdes en « resting eggs », ces derniers se développant en femelles amictiques après une période plus ou moins longue dans les sédiments.

Les scientifiques estiment que les plus vieux fossiles de rotifères bdelloïdes datent d'il y a au moins 35 millions d'années ⁴³ et l'horloge moléculaire de ces organismes indiquent que les rotifères bdelloïdes sont encore plus vieux ⁴⁴. De ce fait, il semblerait que les rotifères bdelloïdes soient des asexués anciens. Actuellement, 460 espèces différentes de rotifères bdelloïdes ont été décrites morphologiquement ³⁵. De plus, les études de taxonomie génétique ont permis de trouver de nouvelles espèces appelées espèces cryptiques (elles possèdent la même morphologie mais montrent une diversité génétique ³⁵). Il semble donc que les rotifères bdelloïdes soient soumis à la spéciation, ce qui est en contradiction avec l'hypothèse selon laquelle la reproduction sexuée est l'unique mécanisme permettant l'évolution en espèces différentes ³⁵.

1.6.2. Avantages et inconvénients de la parthénogenèse

Bien que la survie des organismes asexués soit vouée à l'échec sur le long terme, l'asexualité présente tout de même quelques avantages que les organismes sexués n'ont pas. Par exemple, les organismes asexués n'ont pas à trouver un partenaire pour se reproduire, contrairement aux organismes sexués qui doivent faire l'effort de trouver un partenaire. Cet effort représente un certain coût dans la dépense énergétique des organismes sexués. De ce fait, afin de réduire le coût énergétique de la reproduction, les organismes sexués doivent vivre dans des populations assez denses, permettant la rencontre rapide d'un partenaire. Comme les organismes asexués échappent à ce coût énergétique, ils peuvent vivre dans des populations moins denses et même coloniser de nouveaux habitats avec un seul individu ^{36,45}.

Le fait d'être asexué et de se reproduire par parthénogenèse permet également d'augmenter sa descendance comparé à un sexué. Une femelle sexuée va produire un zygote qui donnera un embryon mâle ou femelle (50:50) qui devra trouver un second partenaire du sexe opposé avant de se reproduire, alors qu'une femelle asexuée obligatoire produira toujours des embryons femelles. Comme ce sont les individus femelles qui engendrent directement la descendance, leur population va s'accroître plus rapidement si ils ont le même nombre de descendants que les sexués. Nous pouvons donc en déduire que les femelles asexuées produisent deux fois plus de descendance que les femelles sexuées en n'investissant pas dans les mâles. C'est ce que les scientifiques appellent le « *cost of males* » ou le « *twofold cost of sex* » ⁴⁵.

Pour contrebalancer ces désavantages de la reproduction sexuée, les organismes sexués possèdent des mécanismes qui leur confèrent des avantages que les organismes asexués n'ont pas :

- **Hypothèse de l'évolution accélérée selon Fisher et Muller (Fig. 9):** les organismes sexués sont plus rapides à évoluer pour s'adapter à un nouvel environnement dans une population de taille finie. En effet, si ce nouvel environnement nécessite l'apparition d'une série de mutations, la recombinaison méiotique permettra aux organismes sexués d'« obtenir » les différentes mutations plus rapidement au sein du même individu alors qu'un organisme asexué doit voir apparaître ces mutations une à une au sein de son propre génome, ce qui prendrait beaucoup plus de temps ⁴⁵.

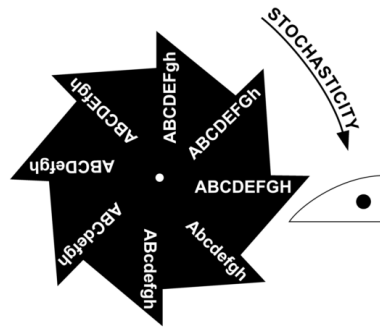


Figure 10 : Représentation schématique de la théorie du cliquet de Müller : une fois qu'une mutation est acquise, il est impossible de faire marche arrière et de perdre cette mutation, alors que d'autres mutations apparaissent et s'accumulent. Van Doninck *et al*, 2003.

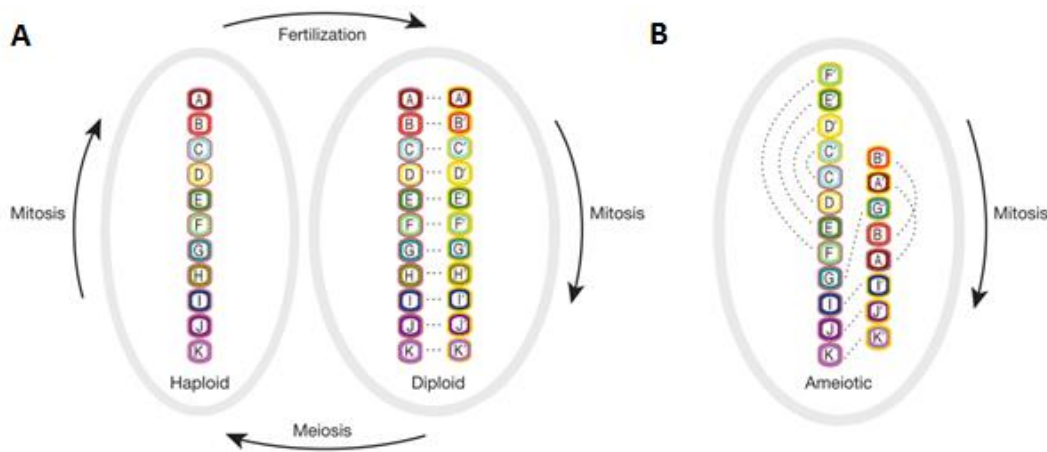


Figure 11 : Organisation du génome dans une reproduction méiotique et améiotique. Les lettres représentent les différents gènes et les lignes en pointillés relient les allèles entre eux. (a) Reproduction méiotique : chaque gène est présent en deux copies (allèles) et chacun des deux chromosomes homologues possède un des deux allèles d'un gène. Il y a donc une distribution égale du matériel génétique sur les 2 chromosomes homologues, ce qui permet la méiose. (b) Reproduction améiotique : les deux copies (allèles) d'un gène sont distribués parmi différents chromosomes, soit les deux copies sont présentes sur un même chromosome. La distribution du matériel génétique est donc inégale et on ne retrouve pas de chromosomes homologues, indiquant l'absence de méiose. Flot *et al*, 2013.

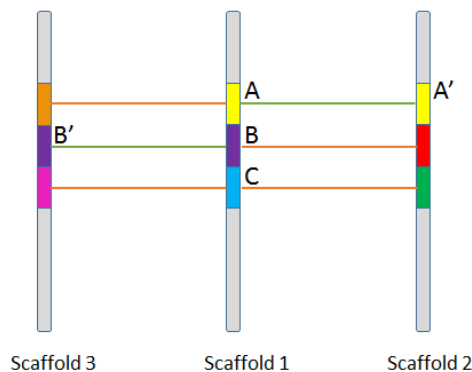


Figure 12 : Représentation schématique du « colinear breakpoint » ou de la perte de synténie. Les rectangles colorés représentent les différents allèles localisés sur un scaffold. La barre horizontale verte entre deux rectangles colorés signifie que deux allèles homologues sont alignés. La barre horizontale orange entre deux rectangles colorés signifie qu'il n'y a pas d'homologie entre les copies se faisant face. Un bloc d'allèles (synténie) présent sur un scaffold ne retrouve donc pas son bloc identique sur un autre scaffold ; les allèles semblent réarrangés, ce qui empêche l'alignement des chromosomes homologues et donc la méiose. La région C', située sur un scaffold 4, n'est pas représentée sur ce schéma.

- **Théorie de la Reine Rouge** : cette théorie fait référence à la suite de l'histoire des « Aventures d'Alice au pays des merveilles », « De l'autre côté du miroir », dans laquelle la Reine Rouge dit à Alice « tu dois courir autant que tu le peux pour rester à la même place » (Lewis Carroll, 1872). Cette théorie repose en fait sur la course à « l'armement » entre espèces (Eshel, 1991). Les espèces présentes dans un environnement changent continuellement leur génotype pour tenter d'échapper, par exemple, à des parasites (Van Valen, 1973). Ces derniers doivent donc s'adapter et tenter de bénéficier d'une combinaison de gènes/mutations plus favorable pour contrer l'échappement de leur hôte, et ainsi de suite. Ces adaptations doivent se réaliser rapidement, ce qui est possible *via* la recombinaison méiotique ayant lieu chez les organismes sexués ⁴⁶.
- **La théorie du « Cliquet de Müller »** : cette théorie suppose le fait que, lorsqu'un organisme asexué voit apparaître une mutation délétère au sein de son génome, cette dernière peut difficilement être « supprimée » puisqu'il n'y a pas de recombinaison méiotique. De ce fait, si un organisme asexué de départ acquiert une mutation, en théorie, toute sa descendance possèdera un génome qui contient cette même mutation, et ainsi de suite (cliquet de Müller : impossible de revenir en arrière, **Fig. 10**), cela pouvant mener à l'extinction d'une espèce asexuée si le « *mutational load* » ou « taux de mutations délétères » devient trop important. Les organismes sexués, quant à eux, peuvent éviter cette accumulation de mutations grâce à la recombinaison et ainsi recréer des individus avec moins de mutations que la lignée parentale ^{45,47}.

1.7. Description du génome des rotifères bdelloïdes (*A. vaga*)

1.7.1. Une structure génomique incompatible avec le processus de méiose classique

Le séquençage du génome d'*A. vaga* a permis la mise en évidence de la première preuve positive de l'asexualité des bdelloïdes : une structure génomique incompatible avec une méiose classique ⁴⁸. Dans la reproduction sexuée, chaque chromosome possède un homologue, ceux-ci formant une paire. De plus, chaque gène est présent en deux copies chez un diploïde (allèles) et chaque chromosome homologue possède sa copie de ce gène. Les gènes sont également arrangés dans un ordre qui est conservé au sein de la paire de chromosomes homologues, formant ainsi des synténies. Tout ceci permet l'appariement des chromosomes homologues et leur alignement correct durant la méiose afin d'assurer une distribution égale du matériel génétique dans les gamètes (**Fig. 11a**). Dans le génome du rotifère bdelloïde *A. vaga*, certaines paires alléliques sont localisées sur le même chromosome (la majorité en direction inversée = palindrome) au lieu d'avoir chaque allèle sur un chromosome homologue. Si un « chromosome homologue » contient les deux copies d'un gène, il n'y a pas d'autre « chromosome homologue » avec cette copie ce qui rend impossible l'appariement des chromosomes durant la méiose (**Fig. 11b**). Ceci est la première preuve positive de l'absence de méiose chez les rotifères bdelloïdes ⁴⁸.

La deuxième est la présence de « *colinear breakpoints* » ou « points de cassure colinéaire » ⁴⁸. Les scientifiques parlent de « *colinear breakpoint* » lorsqu'ils observent une perte de synténie au niveau du génome. Ainsi, l'étude de la structure du génome d'*A. vaga* a montré qu'une région *A* sur un scaffold *1* du génome peut avoir une région homologue *A'* située sur un scaffold *2*. Le problème est que la région *B* adjacente à la région *A* (située entre deux points de cassure) peut avoir une région homologue *B'* située sur un scaffold *3*. Ainsi, les régions homologues *A'*, *B'* et *C'* des régions *A*, *B* et *C* du scaffold *1* peuvent être éparpillées au niveau de plusieurs scaffold différents (*2, 3 et 4*) (**Fig. 12**). De ce fait on ne retrouve pas de chromosomes

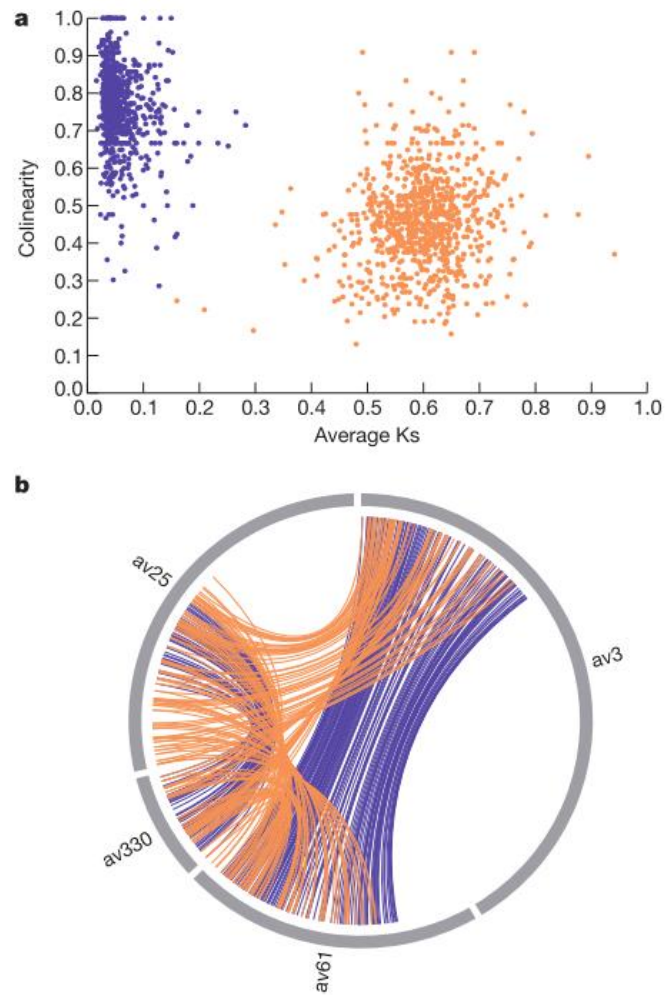


Figure 13 : Représentation de la tétraploïdie dégénérée du génome d'*A. vago*. a : « l'analyse de la synténie intragénomique révèle la présence de deux groupes de régions colinéaires : les allèles en mauve et les ohnologues en orange. Les allèles sont caractérisés par une grande proportion de gènes colinéaires et un Ks (synonymous divergence) très faible. Les ohnologues, quant à eux, possèdent moins de gènes colinéaires mais leur Ks est plus élevé. b : Représentation d'un génome tétraploïde dégénéré sur quatre scaffold : les paires de gènes alléliques sont connectées par les courbes violettes et les paires de gènes ohnologues sont connectées par les courbes oranges. » Flot *et al.*, 2013.

homologues et donc pas d'appariement possible essentiel lors d'une méiose classique. Ceci démontre également une évolution améiotique de ce rotifère bdelloïde.

1.7.2. Tétraploïdie dégénérée

Les scientifiques ont également confirmé que le génome d'*A. vaga* est « tétraploïde dégénéré »⁴⁹. « La présence de deux classes de paires colinéaires est cohérente avec l'existence d'une structure tétraploïde comprenant des allèles (homologues récents) et des ohnologues (homologues anciens formés par duplication génomique ou une ancienne hybridation) » formant les paires colinéaires⁴⁸. Chez *A. vaga*, certains gènes sont présents au sein d'une paire colinéaire alors qu'ils sont absents au sein de la seconde paire colinéaire. Cela semble signifier une tétraploïdie ancienne. En effet, la divergence entre les ohnologues est d'environ 16,4% alors que la divergence au sein d'une paire colinéaire est d'environ 3,8%, ce qui a amené les chercheurs à considérer le génome d'*A. vaga* comme étant 'tétraploïde dégénéré'⁴⁸ (**Fig. 13**).

1.7.3. Le génome des bdelloïdes semble contenir un nombre élevé de transferts horizontaux (HGT)

L'étude du génome d'*A. vaga* a montré qu'environ 8 % des gènes ne possèdent pas d'origine métazoaire (gènes d'origine végétale, bactérienne ou fongique) et auraient donc été acquis par transfert horizontal (*Horizontal Gene Transfert* : HGT)^{38,48,50}. Ce pourcentage est élevé en comparaison avec les rotifères sexués, comme les monogononts (1,8 %) ou en comparaison avec d'autres métazoaires (0,5-1 %) ⁴⁷. Cela pourrait s'expliquer par les cycles de dessiccation/réhydratation. En effet, la dessiccation entraînerait une perméabilisation des membranes des bdelloïdes, ce qui pourrait favoriser l'entrée de gènes étrangers. Par ailleurs ces gènes pourraient être intégrés dans le génome lors de la réparation des cassures double brins associé au processus de dessiccation. Ceci reste néanmoins spéculatif et doit être démontré.

Certains des gènes acquis par HGT montrent un contenu en GC différent de celui retrouvé dans les gènes propres aux bdelloïdes, ce qui signifie que ces gènes ont été acquis récemment. De plus, certains gènes récemment acquis par HGT sont « uniques à des lignées spécifiques de bdelloïdes, comme par exemple celles habitant dans les milieux soumis à la dessiccation »⁵⁰. Les gènes récemment acquis par HGT auraient donc contribué à la spéciation des bdelloïdes, en apportant certains avantages au niveau enzymatique/métabolique⁵⁰. En effet, environ 80 % des gènes acquis par HGT codent pour des protéines fonctionnelles souvent impliquées dans des fonctions spécialisées comme la dégradation de toxines, la décomposition des carbohydrates ou la production d'antioxydants^{35,38,47,51}. Ces gènes ne sont donc, en général, pas impliqués dans des complexes protéiques.

L'intégration d'un gène étranger par transfert horizontal ne se réalisant pas facilement chez les eucaryotes, les scientifiques se sont demandé comment les bdelloïdes pouvaient intégrer autant de gènes étrangers dans leur génome. En effet, les métazoaires ne sont pas connus à contenir des mécanismes tels que la conjugaison, la transformation ou la transduction, que l'on retrouve chez les procaryotes⁴⁷.

Chez certains métazoaires, les HGT peuvent résulter d'une symbiose ou de parasitisme entre un donneur non-métazoaire et un hôte métazoaire³⁵, ce qui n'est pas connu chez la plupart des rotifères bdelloïdes. Par ailleurs, quand un fragment d'ADN étranger pénètre un corps métazoaire, il doit traverser la membrane cellulaire ainsi que la membrane nucléaire afin de pouvoir s'incorporer dans le génome hôte. De plus, si un gène étranger doit être transmis à la descendance, il doit atteindre l'ADN des cellules germinales qui sont isolées de l'environnement et compartimentées dans une région du corps (les ovaires)⁴⁷. A ce jour nous

ne savons pas comment les rotifères bdelloïdes acquièrent de l'ADN étranger, ceci est étudié au sein du laboratoire du Prof. Van Doninck.

1.8. Lien entre le génome des bdelloïdes et le phénomène de dessiccation

Nous avons vu précédemment que la dessiccation induisait l'apparition de DSBs dans l'ADN des bdelloïdes *A. vaga*. En réalité, on peut émettre l'hypothèse que ces organismes pourraient bénéficier de ces DSBs pour contrebalancer leur asexualité.

- **La tétraploïdie dégénérée permettrait d'augmenter les chances qu'une mutation délétère reste à l'état « récessif » et diminuerait donc le « mutational load »**⁵².
- **La dessiccation permet d'enclencher la réparation des dommages à l'ADN (DSBs).**

Lors d'une dessiccation, les bdelloïdes peuvent également subir des dommages *via* les rayons solaires UV. Il a été montré que seul un événement de dessiccation est capable d'engendrer la réparation de l'ADN des bdelloïdes⁵³.

Nous avons vu précédemment qu'après 48h de réhydratation, le génome des bdelloïdes n'était toujours pas réparé entièrement⁸. **Nous voulons maintenant savoir si l'ADN finira par être entièrement réparé pour redonner le même pattern obtenu avec l'ADN du contrôle hydraté ou s'il restera toujours des DSBs résiduelles. Pour cela, un des buts de ce mémoire est de réaliser des PFGE avec des conditions de réhydratation plus longues (> 48h).**

Nous avons en effet observé au laboratoire que les bdelloïdes réhydratés après une dessiccation survivent et pondent des œufs viables puisqu'ils éclosent et donnent naissance à des individus tout à fait normaux phénotypiquement. Cela est observable assez rapidement (24H-48H après la réhydratation) après une dessiccation et pourtant, les expériences de Hespeels *et al.* (2014) nous ont démontré que le génome des bdelloïdes desséchés et réveillés n'est pas entièrement réparé, même après 48h de réhydratation, alors que les bdelloïdes ont retrouvé un phénotype actif⁸. Cela signifie que le génome des bdelloïdes se réveillant d'une dessiccation et pondant des œufs contient toujours des DSBs. Mais alors, si les œufs sont également touchés par les DSBs, comment peuvent-ils être viables après une dessiccation ? Nous émettons trois hypothèses :

- (1) Les cellules germinales sont protégées contre les dommages à l'ADN induits par la dessiccation ;
- (2) L'ADN des cellules somatiques et germinales est endommagé (DSBs) durant la dessiccation et est partiellement réparé lors de la réhydratation dans les deux types de cellules.
- (3) L'ADN des cellules somatiques et germinales est endommagé durant la dessiccation mais seul l'ADN des cellules germinales est complètement réparé lors de la réhydratation.

La méthode PFGE ne permet pas de valider ou de réfuter ces hypothèses puisque cette technique permet seulement d'étudier l'intégrité génomique sans faire la distinction entre le génome des cellules somatiques et celui des cellules germinales.

Dès lors, nous devons, dans ce mémoire, mettre au point une technique qui consiste à visualiser l'ADN dans les différentes cellules des bdelloïdes. De plus, une coloration de l'ADN des noyaux cellulaires nous permettra de distinguer les cellules somatiques des cellules germinales et nous pourrons donc étudier les dommages à l'ADN dans les deux

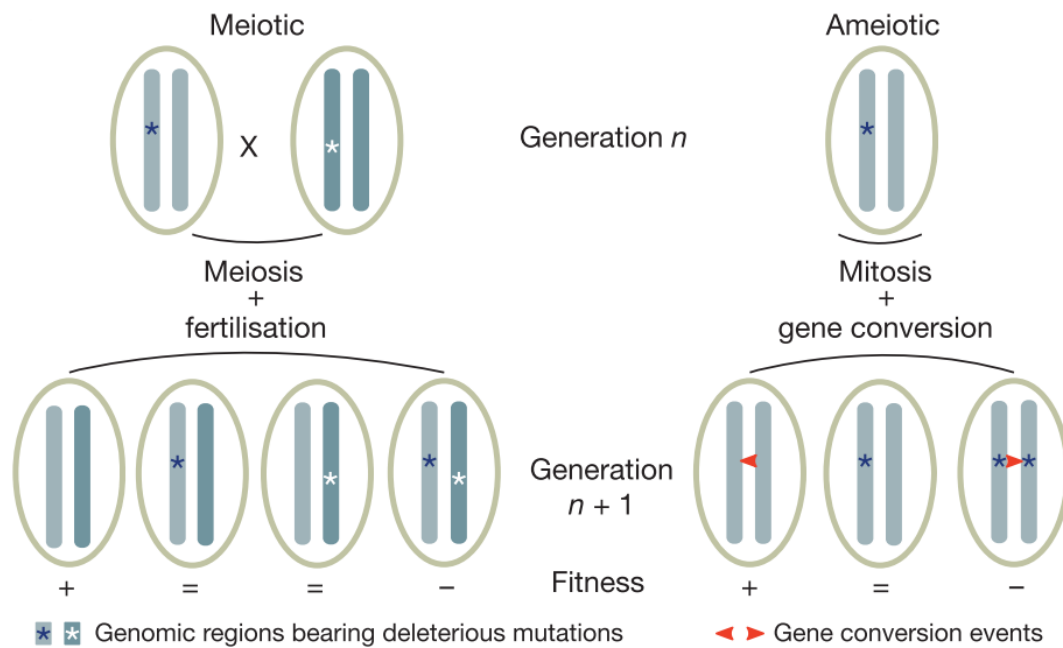


Figure 14 : Phénomène de conversion génique chez des organismes améiotiques en comparaison avec la fertilisation. La conversion génique permet de copier la région d'un allèle, situé sur un chromosome homologue, sur l'allèle correspondant, situé sur l'autre chromosome homologue. La région contenant la mutation peut être copiée sur l'autre allèle, rendant la mutation à l'état homozygote, ou alors la région sans mutation peut être copiée et ainsi effacer la mutation sur l'autre allèle. En résumé, soit on augmente le taux de mutations, soit on le diminue. Cela est également vrai lors de la fertilisation, puisque la combinaison de chromosomes homologues peut être variée, résultant ainsi en plus ou moins de mutations au sein de la descendance. Flot *et al.*, 2013.

types de cellules, dans différentes conditions de dessiccation. Cette technique est le *Terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP Nick End Labelling* (TUNEL) qui est une technique ayant été développée afin de visualiser les cellules en apoptose ⁵⁴.

- **La dessiccation re façonne la structure génomique.**

Le fait que certains allèles soient présents tous les deux sur un même chromosome pourrait nous faire penser que lors de la dessiccation, des fragments d'ADN se soient « recollés » à d'autres fragments d'ADN et que cela engendre des réarrangements ⁴⁸.

Nous nous intéresserons donc au fait de savoir si, lorsque le génome est réparé, les fragments d'ADN sont assemblés exactement comme dans le génome de départ (avant dessiccation) ou si les fragments sont redistribués de manière aléatoire. Nous nous servirons d'une PFGE couplée à une enzyme de restriction pour tenter de répondre à cette question.

- **La dessiccation permet la conversion génique et empêche l'accumulation de mutations.**

Étant donné l'étendue du génome des bdelloïdes (49 300 gènes), nous pouvons penser qu'il est rare que les régions colinéaires soient touchées par une DSB au même endroit au cours d'une même dessiccation. De ce fait, la région colinéaire d'un chromosome pourrait servir de modèle à la région homologue, touchée par une DSB et recopier sa copie sur l'autre pour réparer ce DSB. Les scientifiques nomment ce phénomène « conversion génique » (**Fig. 14**). Ce phénomène permet de supprimer des mutations délétères et ainsi de ralentir le phénomène « cliquet de Müller » vu précédemment (cf. 1.6.2) ^{8,35}. Cependant, la conversion génique est un phénomène à double tranchant puisque la mutation délétère peut aussi être copiée sur l'autre copie de l'autre chromosome et ainsi se retrouver à l'état homozygote (**Fig. 14**). Si c'était le cas, les individus concernés seraient éliminés par la sélection naturelle ⁴⁸. Enfin, c'est donc probablement la conversion génique et donc la dessiccation qui permet aux deux régions d'une paire colinéaire d'avoir une faible divergence entre eux ⁴⁸.

- **La dessiccation permettrait le mécanisme HGT au sein du génome des bdelloïdes.**

La dessiccation est supposée jouer un rôle important dans les HGT puisqu'elle induit des cassures double brin de l'ADN mais aussi des dommages transitoires à l'intestin et au lumen des ovaires ³⁸. De ce fait, lors de la dessiccation chez les rotifères bdelloïdes, l'ADN étranger ingéré lors des repas pourrait traverser la paroi intestinale pour arriver dans les cellules germinales et ainsi être transmis à la descendance ^{35,38}. Cette intégration d'ADN pourrait également impliquer l'ADN provenant d'autres rotifères bdelloïdes permettant donc un échange de matériel génétique ³⁵. Le mécanisme des HGT chez les rotifères bdelloïdes reste cependant incertain et doit être étudié.

1.9. Lien entre dessiccation et résistance aux dommages oxydatifs

Nous avons vu précédemment que les organismes anhydrobiotes étaient capables de réparer leur ADN afin de survivre à la dessiccation, contrairement aux organismes non anhydrobiotes. Ces mécanismes de réparation de l'ADN impliquent des enzymes de réparation de l'ADN. Nous avons également vu que la dessiccation induisait une surproduction de ROS et donc une accumulation de dommages oxydatifs. De ce fait, les enzymes et les protéines impliquées dans la réparation de l'ADN devraient être oxydées et non fonctionnelles, ou en tout cas, devraient perdre leur fonction première lors de la dessiccation. Les scientifiques ont donc pensé que ces enzymes de réparation de l'ADN devaient être protégées, au moins partiellement, contre les

dommages oxydatifs, chez les anhydrobiotes, ce qui expliquerait que la plupart des organismes (non anhydrobiotes) ne puissent pas survivre à la dessiccation ⁵⁵.

Dans le but de valider cette hypothèse, Krisko et Radman (2010) ont dosé le taux de carbonylation protéique (dommages oxydatifs) chez des organismes radio-sensibles (*Escherichia coli*) et des organismes radio-résistants (*D. radiodurans*) irradiés ³³. Ils ont observé qu'une irradiation dix fois plus importante était nécessaire chez *D. radiodurans* pour obtenir le même taux de carbonyles que chez *E. coli*, ce qui suggère qu'il existe un effet tampon protecteur qui protège contre les dommages oxydatifs jusqu'à un certain niveau de radiation chez les organismes radio-résistants ³³. De plus, ils ont également observé que « la mortalité de *D. radiodurans* et *E. coli* est fortement corrélée au taux de carbonylation protéique » ³³. Il semblerait donc que l'accumulation de protéines carbonylées entraîne la mort des organismes lorsque le taux de carbonylation est devenu tellement important que la cellule ne peut plus y remédier.

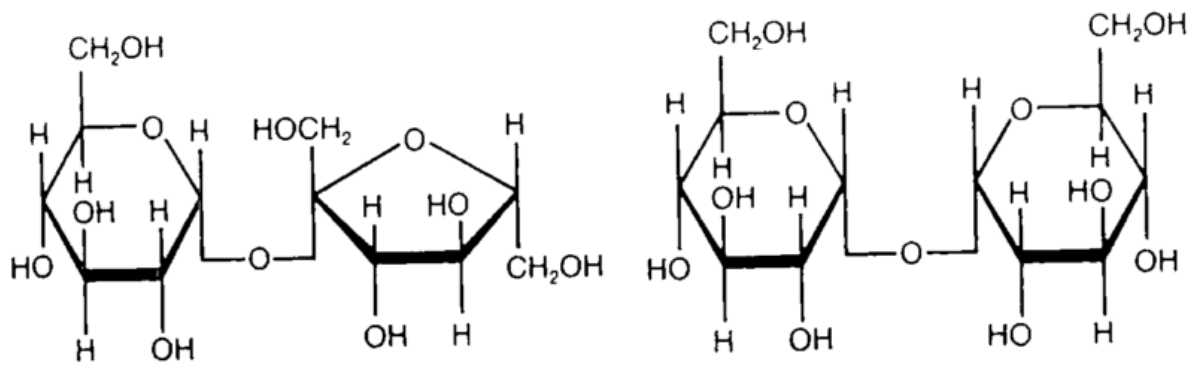
Krisko *et al.* (2012) ont réalisé des expériences similaires chez les métazoaires en comparant les rotifères bdelloïdes et le nématode *Caenorhabditis elegans*, connu pour sa radio-sensibilité ⁵⁶. Ils ont mesuré la fécondité et le taux de carbonylation en rapport avec la dose de radiations appliquée (Gy). Comme pour *D. radiodurans*, ils ont observé que les rotifères bdelloïdes nécessitent une dose de radiations plus élevée pour atteindre le même taux de carbonylation que chez *C. elegans*, suggérant également l'existence d'un effet tampon protecteur contre les dommages oxydatifs chez ces bdelloïdes. De plus, la fécondité était négativement corrélée au taux de carbonylation ⁵⁶, tout comme la survie de *D. radiodurans* ³³. De ce fait, l'accumulation de protéines carbonylées serait nocive pour les organismes soumis aux radiations comme à la dessiccation, et pourrait mener à leur mort ³³.

Dans ce mémoire, nous voulons savoir si (1) l'entrée en dessiccation induit ou non des dommages oxydatifs de manière significative, (2) la diminution du taux de survie chez les rotifères bdelloïdes au fur et à mesure de la dessiccation est, comme chez *D. radiodurans*, due à l'accumulation progressive de protéines carbonylées dans ces organismes et (3) s'il existe un mécanisme de réparation des dommages oxydatifs chez les bdelloïdes. Nous allons donc étudier la carbonylation protéique durant la dessiccation chez *A. vaga*. Pour cela, nous allons doser le taux de carbonylation protéique chez des individus soumis à différents temps de dessiccation, afin d'observer une éventuelle augmentation du taux de carbonyles au fil du temps. Nous allons également doser le taux de groupements carbonyles chez des individus desséchés et réhydratés pendant différents temps afin de voir si les rotifères bdelloïdes possèdent ou non un mécanisme de réparation des dommages oxydatifs.

1.10. Les mécanismes de résistance à l'anhydrobiose

Nous avons vu précédemment que l'anhydrobiose est généralement accompagnée d'une accumulation de ROS au sein des anhydrobiotes et que ces ROS sont extrêmement réactifs et nocifs pour l'organisme. De ce fait, les organismes résistants à la dessiccation se sont adaptés afin de contrer l'accumulation de ROS et les dommages causés par ces derniers ³¹. Les différents mécanismes connus de résistance aux dommages oxydatifs vont être décrits ci-dessous.

Nous avons également vu précédemment que la dessiccation induisait la formation de DSBs dans le génome. Les bdelloïdes doivent donc posséder des enzymes de réparation de l'ADN actifs dès le réveil. L'étude du génome d'*A. vaga* a déjà permis de mettre en évidence la présence de « copies multiples de la plupart des gènes de métazoaires



Sucrose

Trehalose

Figure 15 : Structure chimique du tréhalose et du sucrose. Crowe *et al.*, 2011.

impliqués dans la réparation de l'ADN et la recombinaison homologue »⁴⁸. Les mécanismes exacts de réparation de l'ADN sont cependant encore inconnus chez les bdelloïdes et ne seront pas détaillés dans ce mémoire.

1.10.1. Les enzymes anti-oxydantes

L'étude du génome d'*A. vaga* a mis en évidence la présence d'une quantité non négligeable de gènes impliqués dans les mécanismes d'oxydo-réduction (antioxydants) puisque ces gènes seraient présents en quantité supérieure par rapport aux autres métazoaires⁴⁸. Les expériences réalisées par Hespeels *et al.* (2014) ont montré que les rotifères bdelloïdes *A. vaga* et *A. ricciae* possèdent des enzymes antioxydantes dont la fonction est susceptible de neutraliser les ROS. Ces enzymes sont, par exemple, l'oxyde nitrique dioxygénase, la monooxygénase nitrilotriacetate et l'oxydase nitroalkane⁴⁷. Ces rotifères bdelloïdes possèdent également des enzymes antioxydantes glutathione S-transférase (GST), glutathione réductase (GR) et aldocéto réductase dont 19 % ne sont pas d'origine métazoaire et ont donc été acquis par HGT⁴⁷.

1.10.2. Les sucres non-réducteurs

Il semblerait que la capacité de certains organismes anhydrobiotes à survivre à la dessiccation soit corrélée à la production de sucres non-réducteurs tels que le tréhalose (α -D-glucopyranosyl-(1-1)- α' -D-glucopyranoside, **Fig. 15a**) que l'on retrouve « chez les animaux, les champignons et certaines plantes de résurrection comme *Selaginella* »¹, mais aussi chez certaines bactéries⁵⁷ et cyanobactéries (en petites quantités)⁵⁸. Le sucrose (α -D-glucopyranosyl-(1-2)- β -D-fructofuranoside, **Fig. 15b**) est également un sucre non-réducteur et est retrouvé, « tout comme d'autres oligosaccharides (raffinose, stachyose...), chez les plantes de résurrection également (*C. plantagineum*) et chez les graines végétales ».^{1,12} Le rôle de ces sucres non-réducteurs serait de protéger les structures biologiques (protéines, membranes...) lors de l'anhydrobiose. En effet, selon la théorie de remplacement de l'eau, les sucres non-réducteurs permettraient aux membranes de conserver leur intégrité durant la dessiccation et permettraient également aux protéines et aux acides nucléiques de conserver leur conformation native^{1,59,60}. Une seconde théorie, la théorie de vitrification, propose que les sucres non-réducteurs possèdent la capacité d'augmenter la viscosité cytoplasmique jusqu'à créer un état vitreux (« de glace »), communément appelé la « vitrification »^{61,62}. Cet état emprisonnerait les macromolécules qui se retrouveraient comme « figées » et protégées de la dénaturation¹. De plus, cet état empêcherait la désorganisation (homogénéisation) des membranes puisqu'il empêcherait la transition de la phase « solide » à la phase « gel » des membranes.

• Le tréhalose

Comme nous l'avons vu, le tréhalose est un disaccharide non-réducteur que l'on retrouve chez bon nombre d'organismes anhydrobiotes (cf. point sucres non-réducteurs).

La synthèse du tréhalose repose sur une réaction assez simple : l'enzyme tréhalose-6-phosphate synthase catalyse l'addition d'un UDP-glucose sur un glucose-6-phosphate pour former du tréhalose-phosphate. Ensuite, ce dernier est converti en tréhalose *via* l'action de l'enzyme tréhalose-phosphate phosphatase⁵.

Le tréhalose serait impliqué dans le remplacement de l'eau et/ou dans la vitrification, ce qui protégerait les membranes et les protéines cellulaires contre les effets de la dessiccation^{61,62}. Outre le remplacement de l'eau et l'induction d'un état vitreux, il semblerait que le tréhalose joue également un rôle d'antioxydant. En effet, le tréhalose permettrait de protéger les protéines contre les attaques par les ROS et empêcherait donc la formation de groupements carbonyles sur ces protéines⁶³.

Enfin, le tréhalose semble également protéger les cellules au niveau de leur ADN, en réduisant la formation de DSBs lors d'une exposition aux radiations β et γ . Cette protection semble de plus être proportionnelle à la concentration en tréhalose ⁶⁴.

Le tréhalose semble donc être un acteur important dans la survie à la dessiccation. Comme ce disaccharide a été détecté chez de nombreux organismes anhydrobiotes (nématodes, tardigrades...), les scientifiques ont également recherché le tréhalose chez les bdelloïdes. Pour cela, ils ont réalisé une chromatographie gazeuse afin de détecter les différents carbohydrates présents dans les échantillons ^{1,65}. Cependant, aucune trace de tréhalose n'a été trouvée dans les extraits de carbohydrates provenant des rotifères bdelloïdes *Philodina roseola* et *A. vaga*.

Une seconde étude a eu pour but de voir si les rotifères bdelloïdes contenaient au moins la tréhalose-6-phosphate synthase ⁶⁵, enzyme permettant la synthèse de tréhalose et étant hautement conservée chez les différents organismes ^{66,67}. Jusqu'il y a peu, les scientifiques pensaient que les rotifères bdelloïdes étaient non seulement dépourvus de tréhalose mais aussi de tréhalose-6-phosphate synthase étant donné qu'aucun fragment d'amplification n'était obtenu par PCR lorsque les chercheurs utilisaient des amorces spécifiques aux gènes *tps* connus chez les bactéries, les levures et les métazoaires ⁶⁵.

Par après, le séquençage du génome d'*A. vaga* a été « screené » (analysé) dans le but de trouver des gènes impliqués dans le métabolisme du tréhalose ⁶⁸. Contrairement aux résultats précédents, les scientifiques ont découvert la présence de gènes codant pour l'enzyme « tréhalose-6-phosphate synthase » et l'enzyme « tréhalase », probablement acquis par HGT entre des plantes et des bdelloïdes ⁶⁸.

Mais alors, pourquoi les bdelloïdes possèdent-ils une partie des enzymes impliquées dans le métabolisme du tréhalose et pourquoi ne produisent-ils pas de tréhalose (hormis l'absence de l'enzyme tréhalose phosphatase) ?

Étant donné que le tréhalose est connu pour protéger l'ADN contre la formation de DSBs, et que nous avons vu précédemment que la formation de DSBs pourrait jouer un rôle dans l'évolution des bdelloïdes, nous spéculons que les bdelloïdes n'ont pas maintenu le gène codant pour l'enzyme tréhalose-6-phosphate phosphatase. En effet, s'ils possédaient ce gène, alors le tréhalose pourrait être produit, ce qui diminuerait la formation de DSBs lors de la dessiccation et pourrait ralentir l'évolution des bdelloïdes. Dans ce mémoire, nous réaliserons une PFGE avec des bdelloïdes desséchés en présence et en absence de tréhalose extracellulaire, dans le but de voir si la présence de tréhalose diminue bien la formation de DSBs dans le génome des bdelloïdes.

1.11. Conditions favorables à la résistance à l'anhydrobiose

Le taux de survie chez des organismes anhydrobiotes après une dessiccation peut varier suivant de nombreux facteurs environnementaux ou biologiques (propres aux espèces). Lors des expériences réalisées en vue d'étudier et de comprendre le phénomène de dessiccation, les scientifiques tentent de trouver la combinaison de facteurs apportant le meilleur taux de survie des organismes. Pour ce faire, ils peuvent faire varier la vitesse de dessiccation (ou vitesse d'évaporation de l'eau), le taux d'humidité relative dans l'environnement des organismes desséchés, la température, le temps passé en dessiccation, la vitesse de réhydratation ou encore le nourrissage des individus avant la dessiccation ^{69,70}.

Pour ce mémoire, nous allons utiliser le protocole de dessiccation mis au point par Hespeels *et al.* (2014) afin d'obtenir une survie optimale.

Ainsi, afin d'obtenir une meilleure survie des rotifères bdelloïdes, il semblerait que les bdelloïdes nécessitent (1) une vitesse de dessiccation lente ($> 12\text{h}$) ⁶⁹, (2) un substrat avec aspérités (communication personnelle, B. Hespeels), (3) un taux intermédiaire (40-50 %) d'humidité relative ⁶⁹, (4) une température de l'environnement de dessiccation intermédiaire (21°C), bien qu'ils survivent également à des températures très basses (-80°C) ou élevées (60°C, uniquement à court terme) ⁶⁹, (5) une durée de dessiccation adaptée (la survie décroît avec le temps passé en dessiccation) ^{69,71}, (6) une réhydratation rapide ⁶⁹ et (7) une mise à jeun avant la dessiccation ⁷⁰.

Comme des expériences ont montré que les bdelloïdes survivaient mieux à la dessiccation lorsqu'ils étaient en groupe, toutes les dessiccations réalisées au laboratoire se font sur des pools d'individus contenant en moyenne 10 000 à 15 000 individus. Or, pour ce mémoire, nous avons besoin de mettre des individus isolés en dessiccation. Cependant, il a été observé au laboratoire qu'une dessiccation sur des individus présents en nombre réduit, voire seuls, entraînait une chute impressionnante du taux de survie. Il semble donc important d'ajuster les paramètres de dessiccation ou de mettre en place de nouveaux éléments afin de contrebalancer l'effet d'isolement. Cela sera plus amplement discuté dans le point se référant à l'expérience concernant le cycle de vie des bdelloïdes *A. vaga*.

1.12. Cycle de vie des rotifères bdelloïdes

Dans ce mémoire, nous avons accordé de l'importance à étudier les effets de la dessiccation sur le cycle de vie et la biologie de l'espèce modèle en laboratoire, *A. vaga*. Pour cela, nous avons d'abord dû décrire de manière précise le cycle de vie « normal » (en condition hydratée, sans subir de dessiccation) de ce bdelloïde *A. vaga*.

1.12.1. Sleeping Beauty versus 'The Picture of Dorian Gray

Une question importante à se poser est de savoir si le temps passé en dessiccation influe sur l'âge des organismes anhydrobiotes. En d'autres termes, ces organismes continuent-ils à vieillir lorsqu'ils sont dans un état de stase (dessiccation) ou bien leur vieillissement est-il mis en « stand-by » provisoirement ? Des expériences chez le rotifère bdelloïde *M. quadricornifera* ont montré que les bdelloïdes se réveillant d'une dessiccation ont un taux de fécondité ainsi qu'une espérance de vie équivalents à celui des bdelloïdes continuellement hydratés ³⁶. Cette observation supporte donc l'hypothèse selon laquelle la période de dessiccation n'entre pas en compte dans l'âge des bdelloïdes, ce qui peut être comparé à l'histoire de la Belle aux bois dormants (*Sleeping Beauty*) ⁷². Cependant, cela ne semble pas être le cas chez tous les anhydrobiotes. En effet, une étude chez le nématode a montré que la fécondité des organismes se réveillant d'une dessiccation était inférieure à celle des organismes hydratés, supportant l'hypothèse opposée, selon laquelle la période de dessiccation est comprise dans l'âge des anhydrobiotes. Cette situation-ci peut être comparée au portrait de Dorian Gray dans l'histoire racontée par Oscar Wilde ⁷³.

1.12.2. Description générale des cycles de vie de différentes espèces

Pour décrire le cycle de vie d'*A. vaga* du laboratoire, nous allons nous reposer sur les travaux de Ricci (1983), qui a étudié le cycle de vie de neuf espèces de bdelloïdes différentes ⁷⁴. Ces neuf espèces comportent 2 grandes catégories d'organismes : ceux vivants dans des environnements stables (les cours d'eau) et les autres vivants dans des environnements instables, pouvant être sec de temps à autre (les mousses, environnements terrestres). Chaque cycle de vie est décrit selon plusieurs paramètres : (1) l'espérance de vie moyenne des bdelloïdes, (2) la courbe de reproduction avec le point maximum, (3) la courbe de survie, (4) la sénescence (aspect particulier ou non ?) et (5) la vitesse d'éclosion des œufs.

Ces paramètres varient selon les espèces et selon le type d'habitat (stable ou instable). En règle générale, les espèces de bdelloïdes vivant dans des milieux stables (espèces 'aquatiques') ont une période de reproduction assez courte mais intense (effort reproducteur > 1) après laquelle ils meurent assez vite ⁷⁴. D'un autre côté, les espèces vivant dans des milieux instables, soumis à des déshydratations/réhydratations, (espèces 'terrestres') se reproduisent sur une période plus étalée avec une intensité plus modérée (effort reproducteur ≤ 1) et la mortalité est dispersée, pouvant intervenir tout le long de la vie des individus ⁷⁴. L'espèce de rotifère bdelloïde que nous étudions au laboratoire, *A. vaga*, possède des caractéristiques propres aux deux groupes précédemment cités (**Fig. 16**). Cela s'explique par le fait qu'*A. vaga* se retrouve à la fois dans des milieux aquatiques et à la fois dans des milieux terrestres ⁷⁴.

Les résultats que nous obtiendrons au cours de ce mémoire pourront être comparés à ceux de Ricci pour *A. vaga*.

1.12.3. Les impacts de la dessiccation sur le cycle de vie

Outre les dommages engendrés par la dessiccation, cette dernière peut également avoir un impact sur le cycle de vie des organismes anhydrobiotes. Nous avons vu dans les théories *Sleeping Beauty vs Dorian Gray* que le taux de reproduction après la dessiccation était soit équivalent à celui des organismes hydratés, soit inférieur. Cependant, des études chez les bdelloïdes *P. roseola* ³⁶ et *A. ricciae* ⁷⁵ ont montré que la fertilité augmentait après la réhydratation, comparé à la fertilité des organismes hydratés.

Ricci *et al.*, 2007, ont comparé différents paramètres liés à la fécondité chez deux espèces de bdelloïdes soumises à des fréquences de dessiccation différentes : *A. ricciae* et *M. quadricornifera* ⁷⁵. Les deux groupes de bdelloïdes ayant été soumis à la dessiccation et à la réhydratation montrent une augmentation du fitness par rapport aux individus continuellement hydratés (**Fig. 17 et 18**). Pour *M. quadricornifera*, cela s'oppose aux observations réalisées par Ricci en 1987, qui avaient montré que la dessiccation n'entraînait pas d'augmentation de fitness chez *M. quadricornifera* après réhydratation ³⁶.

Les bdelloïdes étant des organismes eutéliques (nombre de cellules défini et donc nombre d'ovocytes défini), une question se pose : comment les bdelloïdes peuvent-ils augmenter leur reproduction (leur nombre d'œufs) si cela est défini préalablement ? La première hypothèse est que les bdelloïdes ne pondent pas tous leurs œufs en condition normale mais ont besoin de la dessiccation pour pouvoir utiliser tous leurs ovocytes. La seconde hypothèse est que les bdelloïdes pourraient produire de nouveaux ovocytes après une dessiccation *via* une eutélie réversible du germarium ⁷².

Ricci *et al.* ont également observé que les populations de rotifères bdelloïdes étant continuellement hydratées voient leur fitness diminué, alors que les populations soumises à des dessiccations produisent des descendants ayant un taux de reproduction plus élevé et vivant plus longtemps ⁷⁵. Il semblerait donc que la dessiccation ait un effet positif sur le cycle de vie des rotifères bdelloïdes.

Une hypothèse est que la dessiccation permettrait de réduire la présence de virus ou de parasites puisque ceux-ci ne résistent pas à la dessiccation aussi bien que les bdelloïdes. Les bdelloïdes étant moins infectés, ils pourraient garder un fitness stable ⁷⁵.

Dans ce mémoire, nous voulons vérifier si les bdelloïdes *A. vaga* sénescents (ne pondant plus d'œufs) sont capables de pondre à nouveau des œufs après une dessiccation.

Nous avons vu qu'une dessiccation sur des individus adultes (pondant encore des œufs au moment de la mise en dessiccation) a montré une augmentation du nombre d'œufs pondus après

la dessiccation par rapport aux bdelloïdes hydratés en continu. Nous voulons donc voir si ce surplus d'œufs sera également retrouvé après une dessiccation réalisée **après** l'arrêt de la ponte des individus sénescents. Lors du cycle de vie d'*A. vaga*, les bdelloïdes sénescents ne pondent plus pour plusieurs raisons possibles :

- (1) Soit il leur reste des œufs mais ils ont besoin du processus de dessiccation/réhydratation pour enclencher leur ponte ;
- (2) Soit ils ont pondu tous leurs œufs mais la dessiccation/réhydratation peut entraîner l'eutélie réversible du germarium et ainsi permettre la production de nouveaux œufs ;
- (3) Soit ils ont pondu tous leurs œufs et la dessiccation ne change rien ;
- (4) Soit les bdelloïdes sont trop vieux, c'est-à-dire qu'ils ont accumulés un taux de dommages oxydatifs (dus au vieillissement) à un point tel que le mécanisme de ponte est altéré et donc stoppé.

Deux issues sont possibles pour cette expérience de dessiccation sur des individus *A. vaga* sénescents ne pondant plus en état hydraté:

- **Les bdelloïdes sénescents réhydratés et réveillés pondent à nouveau :** cela pourrait valider les trois hypothèses précédentes. Cependant, dans ce mémoire, nous avons privilégié l'hypothèse (3). En effet, nous savons que, lors de la réhydratation des bdelloïdes, une série de mécanismes se met en place afin de réparer les différents dommages accumulés lors de la dessiccation. Lors de la réparation des dommages oxydatifs dus à la dessiccation (*via* l'arsenal d'antioxydants présents chez les bdelloïdes), nous pensons qu'il se pourrait que les dommages oxydatifs accumulés tout au long du vieillissement soient également réparés et donc que les mécanismes de réparation ne feraient pas la différence entre les dommages d'origine différente. Cela entraînerait donc un « rajeunissement » des bdelloïdes qui seraient à nouveau capables de pondre. Si c'était bien le cas, nous pourrions parler d'un phénomène de « reset de l'âge ou du fitness » des bdelloïdes.
- **Les bdelloïdes sénescents réhydratés et réveillés ne pondent toujours pas :** cela signifierait que les bdelloïdes sont trop vieux et donc qu'il n'y a pas eu de phénomène de « reset de l'âge » des organismes par la dessiccation. Cela pourrait aussi venir du fait que lors de l'entrée en dessiccation, les bdelloïdes sont tellement vieux qu'ils ne sont plus capables de se replier correctement sur eux-mêmes et donc la préparation à la dessiccation est altérée, ce qui va induire une incapacité (au niveau structural) de se reproduire.

Au terme de cette introduction, voici les différentes questions qui seront abordées lors de ce mémoire :

- Y a-t-il une augmentation des dommages oxydatifs (carbonylation) lors de l'entrée en dessiccation ? Ceux-ci évoluent-ils avec le temps passé en dessiccation ? Y a-t-il un lien entre dommages oxydatifs et survie ?
- Les cellules somatiques et germinales sont-elles affectées de la même manière par la dessiccation (au niveau DSBs) ? Si oui, les mécanismes de réparation sont-ils favorisés dans un type cellulaire en particulier ?
- À partir de quand peut-on retrouver des individus avec une intégrité génomique entièrement restaurée suite à la dessiccation (cinétique de réparation)? Un bdelloïde réhydraté va-t-il conserver des dommages jusqu'à la fin de sa vie ?
- Le tréhalose va-t-il avoir un impact sur le taux de DSBs induites lors de la dessiccation ?
- Le génome fragmenté des bdelloïdes va-t-il se reconstruire selon le génome de départ ou va-t-il être réarrangé autrement ?
- Des bdelloïdes ayant arrêté de pondre suite au processus de vieillissement peuvent-ils récupérer une capacité de reproduction après réhydratation ?

2. Matériel et méthodes

2.1. Protocole général de dessiccation

Les bdelloïdes *A. vaga* ont été détachés de leur substrat (boîte de Petri) en vortexant les boîtes, puis ont été collectés dans des tubes Falcon de 15 mL et centrifugés pendant 25 minutes à 4500 g et 4°C. Ensuite, nous avons déposé 1250 µL de suspension (bdelloïdes dans de l'eau SPA) au centre d'un tapis d'agarose « *Low Melting Point* » (LMP), concentré à 3% dans de l'eau SPA, et coulé dans une boîte de Petri moyenne. Ces boîtes de Petri ont été placées, sans leur couvercle, dans une chambre climatique WEKK 0028 (Voetsch) dans laquelle les conditions de dessiccation suivantes ont été appliquées : diminution linéaire de l'humidité relative de 70% à 55% pendant 17h, diminution linéaire de l'humidité relative de 55% à 41% pendant 1h, suivie de 19h à 41% d'humidité relative (protocole retrouvé dans le papier d'Hespeels *et al.*, 2014). Les bdelloïdes ont ensuite été gardés dans cette chambre et dans ces conditions (41% d'humidité relative) pendant des périodes différentes de dessiccation. Une fois la dessiccation terminée, les bdelloïdes ont été réhydratés avec de l'eau SPA, sauf pour les conditions « contrôle desséché ».

2.2. Extraction protéique

Des bdelloïdes hydratés, desséchés et réhydratés ont été collectés dans des Falcon de 15 mL par centrifugation de 25 minutes à 4500 g et 4°C. Les culots obtenus ont été transférés dans des eppendorfs de 1,5 mL et ont été resuspendus dans 100 µL de solution A (EDTA 50 mM, Tris 10 mM pH 8,0). Ils ont ensuite immédiatement été congelés dans l'azote liquide puis stockés à -80°C.

Tous les échantillons ont ensuite été centrifugés pendant 2 minutes à 16 000 g et les surnageants ont été retirés. Les culots ont été resuspendus à nouveau dans 100 µL de solution A et congelés dans l'azote liquide. Les échantillons ont été centrifugés pendant 5 minutes à 16 000 g, les surnageants ont été retirés et les culots ont été resuspendus dans 60 µL de tampon de lyse (toutes ces étapes ont été réalisées sur glace). Les échantillons ont été congelés dans l'azote liquide et ont été soniqués (3 cycles de 10 fois 1 seconde à 45% et 1 cycle de 5 fois 1 seconde à 65%). Les échantillons sont congelés dans l'azote liquide entre chaque cycle. Enfin, les échantillons sont centrifugés pendant 10 minutes à 12 000 g et 4°C et les surnageants sont conservés et stockés à -80°C.

2.3. Dosage protéique par la méthode Bradford

Nous avons utilisé le dosage de Bradford pour quantifier les protéines dans chaque échantillon. Les standards (0-4 µg) ont été réalisés en diluant 0,1 mg/mL de protéine BSA standard en série (stock : 1 mg/mL ; dilution 10x dans l'eau distillée). Les cuvettes de spectrophotométrie ont ensuite été préparées avec soit la solution de blanc (équivalent à 1 mL de tampon), soit les dilutions du standard BSA, soit les échantillons (2,5 µL/cuvette). Chaque condition a été réalisée en duplicat. Ensuite, le réactif de Bradford (1 mL à partir d'une dilution 5x du stock) a été ajouté dans chaque cuvette test. Les cuvettes ont été retournées pour homogénéiser le mélange, puis incubées pendant 5 minutes à RT (*Room temperature*). Enfin, l'absorbance a été mesurée à 565 nm et la quantité de protéines a été mesurée.

2.4. OxiELISA

Cette technique a été utilisée afin de mesurer le taux de carbonylation protéique dans un nombre défini (10 µg de protéines/mL) de bdelloïdes *A. vaga* soumis à différentes conditions. Le but était d'étudier l'impact des dommages oxydatifs protéiques sur la survie des individus et l'évolution de ces dommages durant la réhydratation des bdelloïdes. Les échantillons [standards (BSA oxydée/réduite) et extraits protéiques de bdelloïdes] ont tout d'abord été préparés et déposés dans la plaque ELISA selon le protocole du kit (OxiSelect Protein Carbonyl ELISA kit, Cell BioLabs). L'OxiELISA a consisté à ajouter l'enzyme *Dinitrophenylhydrazine* (DNPH) aux extraits protéiques des bdelloïdes desséchés pendant 1 à 42 jours et des bdelloïdes desséchés et réhydratés pendant 8h à 48h. La DNPH reconnaît les dérivés de groupements carbonyles protéiques au niveau des acides aminés Pro, Arg, Lys et Thr. Cette enzyme est ensuite immunoblottée avec un anticorps anti-DNPH [dilué 1000x dans du *Blocking buffer* (lait)], lui-même immunoblotté avec un anticorps secondaire couplé à l'enzyme *horseradish peroxidase* (HRP). Cette dernière va ensuite catalyser la transformation d'un substrat, qui aura été ajouté, dont le produit va pouvoir être détecté et quantifié (cf. le matériel et méthode du kit OxiSelect Protein Carbonyl ELISA kit, Cell BioLabs). Tous les tests ont été réalisés en triplicats.

2.5. OxyBlot

Cette technique détecte, par immunoblot, les groupements carbonyles présents sur les protéines endommagées par le stress oxydatif. Contrairement à l'OxiELISA, l'OxyBlot (Western Blot) permet la visualisation des protéines carbonylées sur une membrane, sous la forme de bandes qui apparaissent en fluorescence, et l'intensité de ces bandes peut être comparée directement.

Les échantillons ont été préparés (dérivatisation des protéines par la DNPH) pour la migration sur gel : les échantillons contiennent un volume d'extrait protéique correspondant à 10 µg de protéines d'*A. vaga*, de l'eau pour mettre les différents volumes d'extraits protéiques au même volume (9 µL), un volume de SDS 12% égal au volume de l'« extrait protéique + eau » (9 µL) et un volume double de solution de DNPH (18 µL). Les échantillons sont ensuite incubés 15 minutes à RT et un volume de solution de neutralisation (volume calculé de façon à ne pas dépasser la capacité volumique des puits du gel d'agarose qui est de 50 µL) est ajouté (OxyBlot Protein Oxidation Detection Kit, Millipore). Ensuite, les protéines des échantillons ont été séparées par électrophorèse pendant 55 minutes à 200V (Novex NuPAGE Bis-Tris Electrophoresis System, Invitrogen) dans un gel NuPAGE® Novex Bis-Tris et transférées, selon le même protocole, sur une membrane PVDF pré-mouillée dans le méthanol, pendant 1h et 55 minutes à 38mA. La membrane a ensuite été incubée dans le Blocking Buffer pendant 1h à RT et les protéines ont été marquées aux anticorps selon le premier protocole (OxyBlot Protein Oxidation Detection Kit, Millipore). La révélation a été réalisée en incubant la membrane dans une solution contenant un réactif chémo-luminescent (Pierce ECL Western Blotting Substrate), pendant 5 minutes, et cette membrane a ensuite été photographiée.

2.6. Protocole du TUNEL

Les cassures d'ADN dans le génome des bdelloïdes hydratés et réhydratés ont été détectées à l'aide du protocole TUNEL, originellement mis au point dans le but d'étudier l'apoptose cellulaire⁵⁴. Cette technique consiste à introduire une enzyme (*Terminal deoxynucleotidyl Transferase* : TdT) à l'intérieur d'un organisme, ici *A. vaga*, qui va reconnaître les extrémités 3'-OH terminales des acides nucléiques composant l'ADN (ces extrémités 3'-OH apparaissent lorsque l'ADN est clivé : *Single Strand Breaks* SSBs et DSBs). Cette enzyme va ensuite ajouter des dUTPs, couplés à un fluorochrome, à ces extrémités. Les SSBs et les DSBs vont ainsi apparaître en vert lorsque les organismes seront observés à l'aide d'un microscope confocal.

Les belloïdes ont été détachés de leur substrat en vortexant les boîtes de Petri, puis ont été collectés dans des Falcon de 15 mL. Les Falcon ont été centrifugés pendant 20 minutes à 4000 g et 4°C et les surnageants ont été retirés. Les bdelloïdes ont ensuite été regroupés dans un seul Falcon de 15 mL et centrifugés pendant 20 minutes à 4000 g et 4°C. Les surnageants ont été retirés et les bdelloïdes ont été fixés, pendant 45 minutes à RT, dans 5 mL de Méthanol/Acide acétique (3:1) par Falcon. Après la fixation, les échantillons ont été centrifugés pendant 10 minutes à 2000 g et 4°C et les surnageants ont été retirés. Environ 25 µL du volume résiduel a été déposé sur chaque coverslip, préalablement traités à la poly-L-Lysine pendant 30 minutes, dans une boîte de culture cellulaire 24 puits. Après séchage des dépôts d'échantillons, les membranes d'*A. vaga* ont été perméabilisées en ajoutant 2 mL/puits de tampon citrate 0,1 M pH 3 et en irradiant les bdelloïdes au micro-ondes (30 secondes à 300W). Les coverslips ont été rincés avec du PBS 1x puis traités avec 1 mL/puits de protéinase K (20 µg/mL dans du tampon Tris-HCl 10 mM pH 7,4). La plaque 24 puits a ensuite incubé en chambre humide à 30°C pendant 30 minutes. Une autre étape de perméabilisation possible a été d'ajouter 750 µL/puits de PBS-Triton X-100 1% et d'incuber la plaque à 37°C pendant 45 minutes. Les coverslips ont été rincés avec du PBS 1x pendant 5 minutes puis ont été traités avec la Label Solution et l'enzyme (enzyme diluée 10x dans la Label Solution ; Sigma-Aldrich, *In Situ* Cell Death Detection Kit, Fluorescein) : tous les coverslips ont été retournés sur une goutte de 30 µL du mix de réaction et ont incubé pendant 1h à 37°C. Les coverslips ont ensuite été rincés deux fois avec du PBS 1x dans la plaque 24 puits. Enfin, les coverslips ont été traités avec une solution de DAPI (marquage du noyau : 1 µg/µL dans du PBS 1x : les coverslips ont été retournés chacun sur une goutte de 30 µL de solution de DAPI et ont incubé pendant 5 minutes dans l'obscurité. Ensuite, ils ont été rincés deux fois avec du PBS 1x. Finalement, les coverslips ont été montés sur lame, dans du Mowiol à 56°C, et stockés à 4°C durant la nuit. Les lames ont été observées au microscope confocal le lendemain ou plus tard.

Un contrôle positif a été réalisé en traitant, juste après la perméabilisation, les coverslips correspondant avec une solution de DNase (955 µL Tris-HCl 50 mM pH 7,5, 25 µL BSA 40 mg/mL, 20 µL DNase) : les coverslips ont été retournés chacun sur une goutte de 30 µL de solution de DNase. Ces gouttes ont été déposées sur un parafilm dans une chambre humide, pendant 10 minutes à RT et les coverslips ont ensuite été traités comme les autres échantillons. Pour le contrôle négatif, les coverslips correspondant ont été traités avec la Label Solution dépourvue d'enzyme.

2.7. Cycle de vie d'*A. vaga*

2.7.1. Détermination de l'espérance de vie des bdelloïdes *A. vaga*

Nous avons isolé des individus *A. vaga* dans des puits afin d'étudier leur cycle de vie en conditions de laboratoire. Dans le but de faciliter l'observation des individus, des micropuits ont été creusés dans une plaque de culture cellulaire 12 puits, préalablement remplie avec 2 mL d'agarose 2 % (UltraPure Agarose for Electrophoresis Grade, Invitrogen) par puits. La création de ces micropuits se réalise sous hotte à flux laminaire horizontal. Immédiatement après avoir coulé l'agarose dans les puits, un moule a été déposé dans l'agarose, afin de creuser les puits voulus. Après polymérisation de l'agarose à 4°C, un œuf d'*A. vaga* a été déposé dans chaque puits. Une fois les œufs éclos, les individus « mère » ont été nourris avec 5 µL de jus de salade. Chaque jour suivant l'éclosion, les œufs pondus par la mère ont été comptés et retirés manuellement, jusqu'à la mort de l'individu. Nous avons ainsi obtenu l'espérance de vie moyenne de ces individus en conditions de laboratoire ainsi que leur taux de reproduction.

2.7.2. Optimisation de la dessiccation sur des individus isolés

Nous avons tenté de faire varier plusieurs paramètres afin d'augmenter la survie des individus isolés en dessiccation, sachant que la survie est élevée quand ils se dessèchent en groupe : différents types de contenants ont été utilisés (boîtes de Petri, plaques de culture multipuits), différents volumes d'agarose 2% (UltraPure Agarose for Electrophoresis Grade, Invitrogen) par puits ont été testés (500 µL, 750 µL, 1 mL et 2 mL), un gradient de volume d'agarose a été appliqué ou non (chaque colonne de la boîte contenant un volume différent), deux environnements de dessiccation différents ont été testés (chambre climatique et chambre froide), les bdelloïdes ont été nourris ou non avant dessiccation, une solution de tréhalose a été ajoutée ou non.

De manière générale, les individus ont été prélevés à la main un par un et ont été déposés chacun dans un puits d'une nouvelle plaque de culture cellulaire 12 puits, préalablement remplie avec de l'agarose 2 % (UltraPure Agarose for Electrophoresis Grade, Invitrogen) ou de l'agarose LMP 3 % (Invitrogen, UltraPure™ LMP Agarose). De l'eau SPA a ensuite été ajoutée dans chaque puits afin de former des gouttes de 30 µL. Les plaques 12 puits ont été placées, sans leur couvercle, dans la chambre climatique et les individus ont été desséchés durant 3 jours (l'équivalent de 1 jour de dessiccation à 41% d'humidité relative cf. 2.1) selon le protocole général de dessiccation (cf. point 2.1). Les individus ont ensuite été réhydratés avec de l'eau SPA, puis observés au microscope durant les heures suivantes.

2.7.3. Mise en dessiccation des individus sénescents : la ponte est-elle réactivée après une dessiccation ?

Lorsque les mères du cycle de vie ont arrêté de pondre des œufs, ces individus ont été prélevés un à un dans un volume de 10 µL et placés chacun dans un puits d'une nouvelle plaque 12 puits, préalablement remplie avec 500 µL d'agarose LMP 3 %. 20 µL d'une solution de tréhalose 40 % (Sigma, D-(+)-Trehalose dihydrate) ont ensuite été ajoutés sur chaque individu (voir optimisations 3.4.2). Les individus ont subi 1 jour de dessiccation puis ont été réhydratés en ajoutant 2 mL d'eau SPA dans chaque puits.

2.8. Pulsed-Field Gel Electrophoresis (PFGE)

La PFGE est une électrophorèse à champ pulsé qui permet d'étudier l'intégrité du génome. Cette technique a été utilisée (en suivant le protocole publié par Hespeels *et al.*, 2014) pour étudier l'intégrité génomique de bdelloïdes *A. vaga* hydratés, soumis à différents temps de dessiccation ou à différentes doses de radiations (protons) et soumis à différents temps de réhydratation (cinétique de réparation). Les individus de chaque condition ont été récoltés et ont été répartis en cohortes de 1000 individus par eppendorf de 1,5 mL. Après centrifugations, ces individus ont été resuspendus dans 25 µL de solution A (EDTA 50 mM, Tris 10 mM pH 8,0) et ont été mélangés à 25 µL d'agarose 1 % (InCert™ Agarose Lonza) dissout dans de la solution B (EDTA 200 mM, Tris 100 mM pH 8,0) et gardé à 56°C. Le mélange de 50 µL a ensuite été déposé dans un moule à plug, qui a lui-même été mis à 4°C. Après polymérisation, les plugs ont été démoulés et déposés dans de nouveaux eppendorfs contenant chacun 500 µL de tampon de digestion [250 µL de solution B, 26 µL de protéinase K (ThermoScientific, environ 20 mg/mL), 16,66 µL de solution saline de N-Lauroylsarcosine de sodium (Sigma Life Science) et 207,34 µL d'eau mQ]. Les échantillons ont été placés à 4°C pendant 1h, puis ont été mis à 56°C pendant 18h.

Après deux rinçages au Tris Borate EDTA (TBE) 0,5x (stock : TBE 10x, BioRad electrophoresis purity reagent), les plugs ont incubé dans 2 mL de TBE 0,5x pendant 3h à 4°C, puis ont été placés dans 1 mL d'EDTA 0,5 M pH 8,0 et conservés à 4°C jusqu'à utilisation. Les plugs ont été placés chacun dans un puits d'un gel d'agarose 0,8 % (SeaKem® GTG® Agarose Lonza) préalablement dissout dans du TBE 0,5x et gardé à 56°C. Des échantillons contenant les chromosomes de *S. cerevisiae* (BioRad, Hercules, CA, USA) ont aussi été ajoutés dans des puits du gel afin de contrôler la migration de nos échantillons et d'avoir un étalon de poids moléculaire.

La migration du gel a ensuite été réalisée en utilisant la cuve d'électrophorèse BioRad CHEF-DR II (4°C ; 5,5 V/cm, variation d'angle de 120°C, variations de temps de 60 à 185 s pendant 22h). Après migration, le gel a été immergé dans une solution de révélation [SYBR Gold (Invitrogen, Molecular Probes Nucleic Acid gel stain) dilué 10 000 x dans du TBE 0,5x] pendant 1h, puis a été rincé dans du TBE 0,5x pendant 10 minutes. Le gel a ensuite été scanné avec la caméra BioRad Chemidoc XRS et les photos ont été travaillées à l'aide des logiciels ImageLab 3.0 (paramètres SYBR Gold) et ImageJ.

2.9. Restriction enzymatique

Certaines expériences PFGE ont préalablement nécessité une restriction enzymatique des échantillons afin d'étudier le réarrangement du génome suite à la dessiccation/réhydratation.

Le jour précédant la migration de l'ADN dans le gel, les plugs conservés dans l'EDTA à 4°C ont été rincés 3 fois dans du TE 1x (EDTA 1 mM et Tris-HCl 10 mM) puis ont été immergés dans 100 µL de CutSmart buffer, le tampon dans lequel l'enzyme de restriction utilisée sera fonctionnelle. Les plugs ont ensuite été incubés pendant 16h dans 100 µL de Mix de réaction chacun [enzyme de restriction : NotI, FseI ou AscI (dilution 100x, BioLabs), CutSmart buffer (dilution 10x), H₂O mQ], à 37°C.

Le lendemain (jour de la migration), les plugs ont été rincés 3 fois dans du TE 1x puis 2 fois dans du TBE 0,5x avant d'être conservés à 4°C dans du TBE 0,5x jusqu'à utilisation (dépôt dans les puits du gel).

3. Résultats

3.1. Étude des dommages oxydatifs chez des bdelloïdes *A. vaga* hydratés, desséchés et réhydratés

Un des premiers objectifs de ce mémoire a été d'étudier l'éventuelle accumulation de dommages oxydatifs suite à la dessiccation chez *A. vaga*. Nous voulions voir si ces dommages augmentaient de manière significative lors de l'entrée en dessiccation, s'ils augmentaient avec le temps passé en dessiccation et s'il existait un lien entre dommages oxydatifs et mortalité, suite à une dessiccation prolongée.

Les dommages oxydatifs (carbonylation protéique) ont été évalués à l'aide du kit OxiElisa chez des bdelloïdes hydratés et des bdelloïdes desséchés de 1 à 42 jours.

Une différence significative du taux de carbonylation protéique est observée entre les individus hydratés (contrôle, 4,2 nmol/mg) et desséchés, ces derniers possédant un taux de carbonylation protéique plus élevé (en moyenne 8,1 nmol/mg après 42 jours de dessiccation, **Fig. 19**). Aucune augmentation significative de la carbonylation protéique n'est observée suite à l'augmentation du temps passé en dessiccation par les échantillons (1-7-14-42J).

Une deuxième expérience a été réalisée dans le but d'observer s'il y a ou non une diminution/réparation des dommages oxydatifs lors de la réhydratation des bdelloïdes desséchés.

Une différence significative dans le taux de carbonylation protéique est observée entre les individus hydratés (contrôle hydraté) et desséchés (contrôle desséché) (**Fig. 20**). Contrairement à l'expérience précédente, les individus desséchés 7 jours (contrôle desséché) contiennent moins de carbonylation protéique (22,0 nmol/mg) que les individus hydratés (27,9 nmol/mg). Aucune différence significative du taux de carbonylation protéique entre le contrôle hydraté et les différentes conditions de réhydratation n'est observée. En comparaison avec l'expérience précédente, nous observons également que les valeurs du taux de carbonylation protéique (ng/mg) sont quadruplées (on passe de 6 nmol/mg à 25 nmol/mg en moyenne) dans cette deuxième expérience. Cette variation pourrait être due au fait que l'incubation de la plaque ELISA a été réalisée durant la nuit entière à 4°C, contrairement à l'expérience précédente où cette incubation a été réalisée pendant 2 heures à 37°C.

Dans le but de vérifier si l'incubation de nuit influence le taux de carbonylation protéique mesuré par le kit Elisa, une nouvelle expérience a été réalisée en incubant la plaque ELISA durant 2 heures à 37°C.

Nous observons à nouveau une diminution significative du taux de carbonylation protéique chez les individus desséchés (contrôle, 20,9 nmol/mg) en comparaison avec le contrôle hydraté (24,85 nmol/mg, **Fig. 21**). De plus, il n'y a aucune différence significative du taux de carbonylation protéique entre les individus hydratés (contrôle) et les différentes conditions de réhydratation. Enfin, nous observons encore une fois des valeurs du taux de carbonylation protéique qui sont presque quadruplées (on passe de 6 nmol/mg à 23 nmol/mg en moyenne) par rapport à la première expérience.

Au vu de ces résultats, la fiabilité et reproductibilité des résultats obtenus par le kit Elisa a été mise en doute.

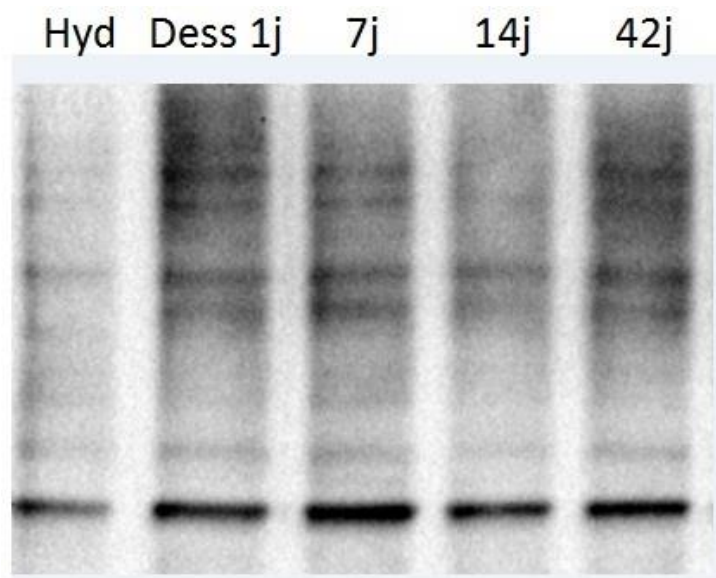


Figure 22 : OxyBlot : Visualisation chémoluminescente de la carbonylation protéique chez des individus *A. vaga* desséchés pendant 1 à 42 jours. Un contrôle « hydratés » et « desséchés » ont été réalisés.

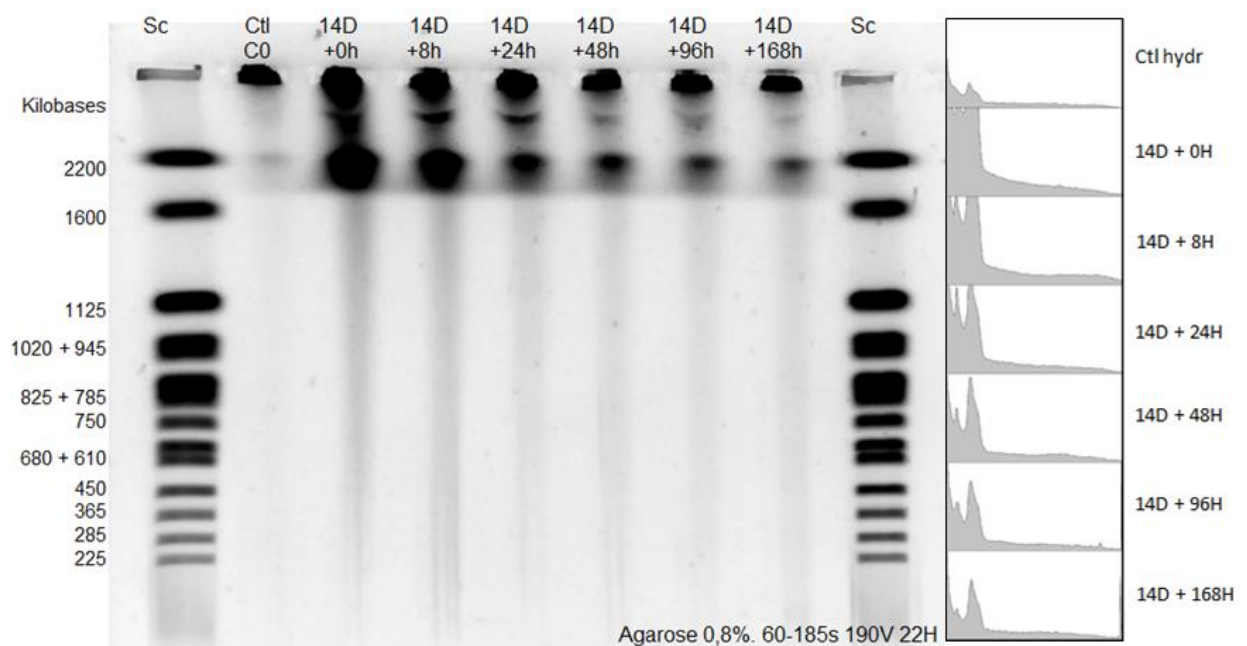


Figure 23 : PFGE : visualisation de l'intégrité génomique lors d'une cinétique de réparation chez 1000 individus *A. vaga*. Un contrôle « hydratés » (puits 2) a été réalisé, ainsi qu'un contrôle « desséchés » 14 jours (puits 3). Chaque puits (puits 3-8) contient environ 1000 individus desséchés 14 jours et réhydratés pendant 0h à 168h (7 jours). Les étalons de poids moléculaire (puits 1 et 9) ont été réalisés avec des chromosomes de *S. cerevisiae*. A droite : quantification des smear (ImageJ).

Afin de trouver une technique alternative pour doser la carbonylation protéique, le taux de carbonylation protéique a été évalué en utilisant la technique OxyBlot (Western Blot). Les échantillons utilisés pour la première expérience OxiELISA (bdelloïdes *A. vaga* desséchés de 1 à 42 jours) ont été réutilisés pour cette expérience. Une quantité identique de protéines (10 µg) a été ajoutée par puits.

Les résultats obtenus avec cette technique montrent l'apparition de plusieurs bandes protéiques au niveau de chaque puits. Les bandes sont visibles lorsque l'enzyme peroxydase catalyse la transformation de son substrat en énergie lumineuse. Les peroxydases sont couplées à des anticorps secondaires et ces derniers reconnaissent les anticorps primaires attachés au niveau des groupements carbonyles des protéines. De ce fait, plus il y a de groupements carbonyles, plus il y a de peroxydases et plus l'énergie émise est élevée, se traduisant en bandes plus intenses au niveau de la membrane. Nos résultats (**Fig. 22**) montrent premièrement qu'il y a moins de carbonylation protéique chez les individus hydratés que chez les individus desséchés, et secondement qu'il n'est pas possible de mettre en évidence une augmentation de la carbonylation entre les différents échantillons desséchés. Un contrôle de charge au rouge ponceau a été réalisé sur notre membrane afin de vérifier que la même quantité de protéines avait été chargée dans tous les puits (Figure non disponible mais le résultat était bon).

3.2. Étude de l'intégrité génomique chez des individus *A. vaga* par la méthode PFGE

3.2.1. Cinétique de réparation de l'ADN après une dessiccation ou une irradiation par protons chez des individus *A. vaga*

Un des buts de ce mémoire était de voir s'il était possible pour les bdelloïdes desséchés de récupérer une intégrité génomique similaire à celle observée pour les individus hydratés, et si oui, combien de temps après la réhydratation des organismes. En effet, si les bdelloïdes sont capables de récupérer un phénotype actif alors même que leur génome contient encore des DSBs, nous nous demandons s'ils doivent ensuite vivre en permanence avec des DSBs résiduelles ou s'ils finiront par réparer l'entièreté de leur génome.

Pour cela, nous avons desséché des pools d'individus *A. vaga* (10 000 - 15 000) pendant 14 jours, nous les avons ensuite réhydratés (8h, 1J, 2J, 4J ou 7J) et nous avons fait migrer leur ADN par électrophorèse à champ pulsé (PFGE). Chaque puits du gel contient un plug d'agarose contenant 1000 individus *A. vaga* lysés. L'étalon de poids moléculaire a été réalisé avec des chromosomes de *S. cerevisiae* et permet de valider la migration. Ces chromosomes ont une taille de 225 à 1600 Kb et le programme de la PFGE que nous réalisons permet de séparer de façon optimale des fragments d'ADN de taille comprise entre 225 et 1600 Kb (la migration est résolue entre 225 et 1600 Kb). Le contrôle contenant des individus hydratés (puits 2) nous montre que les traitements (digestion et lavages) et la conservation (EDTA à 4°C) n'ont pas induit de DSBs (**Fig. 23**) étant donné qu'il n'y a pas de migration de fragments d'ADN et nous ne voyons pas de smear (petits fragments d'ADN) entre 225 et 1600 Kb]. Le contrôle desséché (14JD + 0H réhydratés, **Fig. 23**, puits 3) permet de montrer le niveau basal de DSBs présent dans le génome et engendré suite à une dessiccation de 14 jours, avant toute réhydratation. Nous observons ici un gros spot noir aux environs de 2200 Kb, représentant des fragments d'ADN de grande taille ayant migré hors du plug (DSBs), et nous observons également (entre 225 et 1600 Kb) la présence d'un « smear », c'est-à-dire la présence d'une quantité de fragments d'ADN de tailles comprises entre 225 et 1600 Kb. Plus le temps de réhydratation augmente, plus on observe une diminution d'intensité du smear (**Fig. 23**, 225 – 1600 Kb). Nous observons également une diminution, avec le temps de réhydratation, de l'intensité du patch représentant

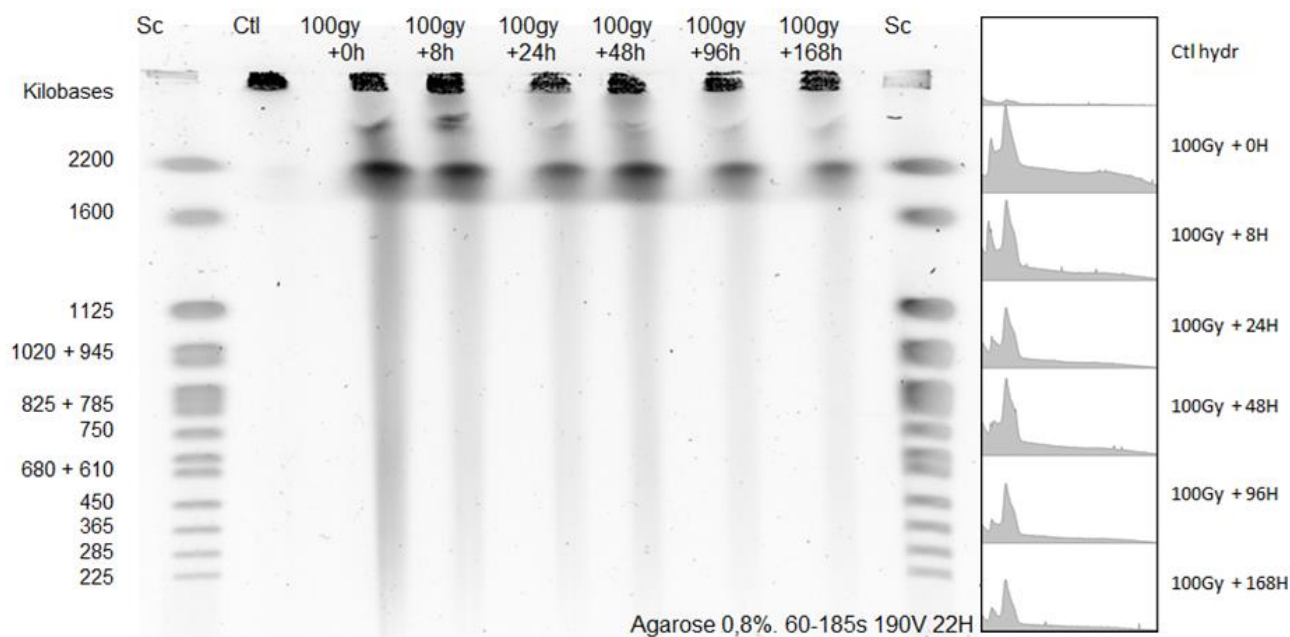


Figure 24 : PFGE : visualisation de l'intégrité génomique lors d'une cinétique de réparation chez 1000 individus *A. vago*. Un contrôle « hydratés » (puits 2) a été réalisé, ainsi qu'un contrôle « irradiés » 100 Gy (puits 3). Chaque puits (puits 3-8) contient environ 1000 individus irradiés à 100 Gy (protons) et réhydratés pendant 0h à 168h (7 jours). Les étalons de poids moléculaire (puits 1 et 9) ont été réalisés avec des chromosomes de *S. cerevisiae*. A droite : quantification des smear (ImageJ).

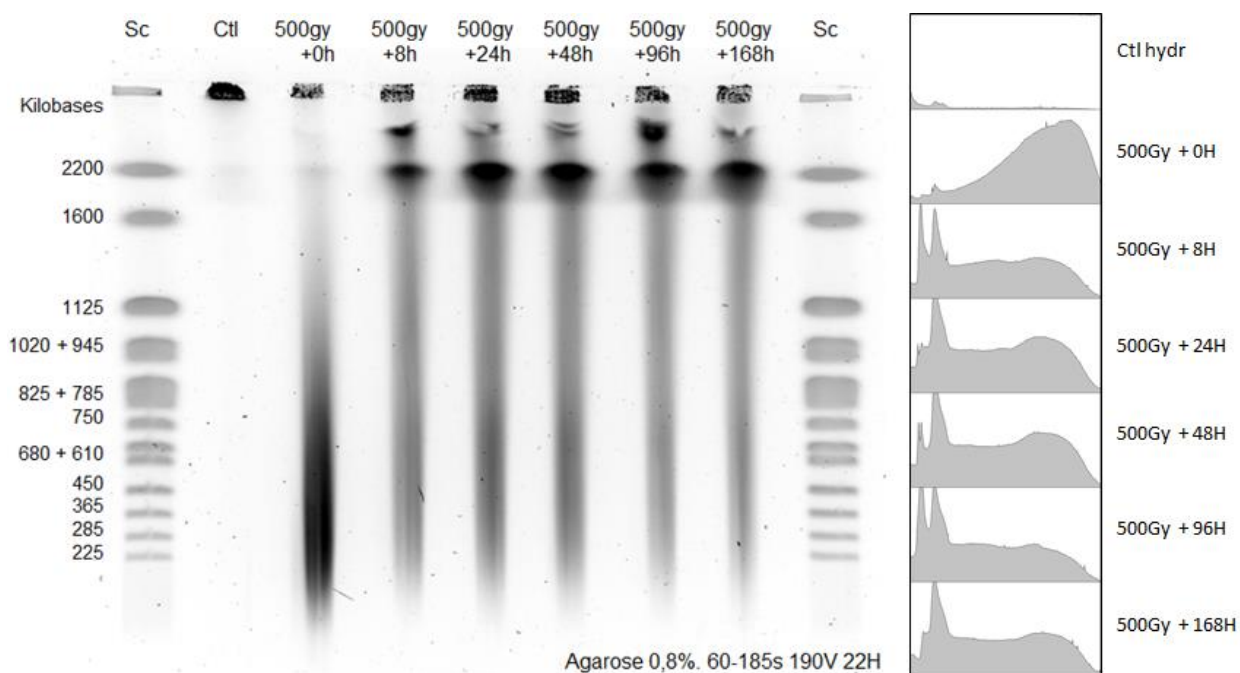


Figure 25 : Visualisation de l'intégrité génomique lors d'une cinétique de réparation chez des individus *A. vago*. Un contrôle « hydratés » (puits 2) a été réalisé, ainsi qu'un contrôle « irradiés » 500 Gy (puits 3). Chaque puits (puits 3-8) contient environ 1000 individus irradiés à 500 Gy (protons) et réhydratés pendant 0h à 168h (7 jours). Les étalons de poids moléculaire (puits 1 et 9) ont été réalisés avec des chromosomes de *S. cerevisiae*. A droite : quantification des smear (ImageJ).

les fragments d'ADN de grande taille (> 2200 Kb, **Fig. 23**). Enfin, après 7 jours de réhydratation (puits 8), nous pouvons voir que l'intégrité génomique des individus n'est toujours pas similaire à celle observée pour les individus hydratés (**Fig. 23**) puisqu'on observe encore la présence de gros fragments d'ADN (> 2200 Kb, moins nombreux que chez les individus réhydratés 4 jours) et d'un léger smear (225 – 1600 Kb).

Nous avons voulu comparer ces résultats obtenus pour une dessiccation à ceux obtenus pour une radiation par protons, étant donné que les deux phénomènes génèrent des cassures d'ADN (DSBs). Cependant, la quantité de dommages générée n'est pas la même en fonction du temps de dessiccation et de la dose de radiations et nous avons donc voulu comparer la réparation de l'ADN au sein de génomes soumis à des quantités de dommages plus ou moins élevées. Pour cela, des individus desséchés 1 jour ont été exposés à deux doses élevées de radiations (100 Gy et 500 Gy).

Les contrôles hydratés du gel réalisé pour l'expérience « irradiations de 100 Gy et 500 Gy » (**Fig. 24 et 25**, puits 2) semblent contenir tous les deux quelques fragments d'ADN de taille supérieure à 2200 Kb (très légers) mais le reste de l'ADN semble être resté dans le plug. Au niveau des individus irradiés à 100 Gy et non réhydratés (0h, **Fig. 24**, puits 3), nous observons un smear entre 225 et 1600 Kb. Par ailleurs, la bande située environ à 2200 Kb et représentant les grands fragments d'ADN est intense signifiant que beaucoup de fragments d'ADN de taille supérieure à 2200 Kb ont migré hors du plug. Au niveau des individus irradiés à 500 Gy et non réhydratés (0h, **Fig. 25**, puits 3), nous observons également un smear entre 225 et 1600 Kb, mais dont l'intensité est plus élevée entre 225 et 680 Kb. De plus, la bande située à environ 2200 Kb n'est presque pas visible. Il semblerait donc qu'il y ait plus de fragments d'ADN de grande taille dans le génome des individus irradiés à 500 Gy.

Comme pour les résultats de la dessiccation, nous observons une disparition progressive du smear (225 – 1600 Kb) avec le temps de réhydratation pour les individus irradiés à 100 Gy (**Fig. 24**). Cependant, nous observons une légère augmentation de l'intensité du smear chez les individus irradiés à 100 Gy et réhydratés 48h (**Fig. 24**, puits 6), comparé aux autres conditions de réhydratation. Pour les individus irradiés à 500 Gy (**Fig. 25**), il n'y a pas de disparition du smear au fur et à mesure de la réhydratation, mais plutôt un « étalement » de la zone la plus sombre du smear (225-680 Kb contenant le plus de fragments d'ADN, **Fig. 25**, puits 3) entre 225 et 1600 Kb (**Fig. 25**, puits 4, 5, 6, 7 et 8), bien qu'on observe encore une intensité légèrement plus élevée entre 225 et 680 Kb. Contrairement aux résultats précédents (**Fig. 23**) et aux résultats pour les individus irradiés à 100 Gy (**Fig. 24**), les fragments d'ADN d'environ 2200 Kb semblent être de plus en plus nombreux jusqu'à 7 jours de réhydratation (**Fig. 25**).

Enfin, dans les deux expériences (100 Gy et 500 Gy, **Fig. 24 et 25**), nous n'observons pas vraiment de différence en termes de quantités de dommages entre les conditions de réhydratation de 4 jours et de 7 jours, signifiant probablement que la réparation de l'ADN n'évolue plus ou en tout cas évolue plus lentement. Par ailleurs, les individus irradiés ont commencé à se reproduire après environ 48H de réhydratation.

3.2.2. Visualisation du réassemblage génomique au cours de la réparation d'ADN suite à une dessiccation ou une irradiation par protons chez des individus *A. vaga*

Les résultats précédents nous ont montré que les bdelloïdes sont capables de réparer leur ADN, même si des fragments étaient encore présents. Nous avons ensuite voulu savoir si l'ADN était réparé conformément au « modèle de départ » ou s'il était réarrangé de manière aléatoire. Pour cela, nous avons utilisé la technique PFGE couplée à l'utilisation d'une enzyme de restriction (NotI : coupe des régions de 8pb = rare donc donne des fragments d'ADN permettant d'obtenir des bandes bien résolues) sur nos échantillons. Nous avons réalisé ces expériences en reprenant les conditions des expériences précédentes concernant la réparation de l'ADN (autres plugs des mêmes conditions mais traités avec l'enzyme de restriction). Afin de vérifier que le profil de restriction obtenu était bien dû à l'action de l'enzyme de restriction, nous avons réalisé un « contrôle + buffer » (**Fig. 28**, puits 9). Cela signifie que ces individus ont été soumis aux mêmes conditions (lavages, stockages, température) que celles appliquées aux autres plugs (exposés à NotI) sans l'enzyme de restriction. Cela permet donc de vérifier que les traitements (hors enzymes de restriction) n'induisent pas de « dommages non-spécifiques » à nos échantillons. Nous n'observons aucun smear et aucune bande (**Fig. 28**, puits 9), comme dans le contrôle hydraté (**Fig. 28**, puits 2), ce qui signifie que le profil de restriction est bien dû à l'action de l'enzyme de restriction.

Le gel contenant les individus desséchés 14 jours et réhydratés (8h, 1J, 2J, 4J et 7J) montre l'apparition d'un profil de restriction (**Fig. 26**). L'ADN des individus présents dans les puits 7, 8 et 9 n'a pas bien migré suite à un problème dans le gel d'agarose, comme nous le montre l'étalon de poids moléculaire situé dans le puits 10. Cela explique un profil de restriction moins clair dans ces puits comparés aux autres puits. Aucune différence entre les différentes conditions n'est observée. Une dessiccation de 14 jours induit des dommages à l'ADN (DSBs) mais pas suffisamment pour détruire le profil de restriction généré par NotI.

Les résultats pour les individus desséchés et irradiés à 100 Gy (protons, **Fig. 27**) montrent également l'apparition du profil de restriction enzymatique, pour toutes les conditions et même dans la condition « 100 Gy sans réhydratation » (présence des bandes de 365, 500, 610, 680, 750, 825, 1200 et 1600 Kb), bien que l'accumulation de DSBs à 100 Gy réduit la visibilité des bandes (**Fig. 27**).

Chez les individus irradiés à 500 Gy (protons), nous retrouvons bien le profil de restriction au niveau du contrôle hydraté même si le « pattern » n'est pas parfaitement visible et nous avons dès lors marqué les bandes (**Fig. 28**). Suite aux dommages induits par les radiations de 500 Gy (protons) et avant réhydratation, des fragments de 450 Kb en moyenne ont été générés au niveau du puits 3 (**Fig. 28**) et une disparition des bandes du profil de restriction précédemment résolues est observée dans ce puits. Des bandes d'environ 365, 500, 610 et 825 Kb sont de nouveau visibles à partir de 8h de réhydratation des individus, même si l'intensité de ces bandes est très faible (**Fig. 28**). Après le temps de réhydratation maximum (7J, **Fig. 28**, puits 8), les bandes d'environ 365, 500, 610, 825 et 1300 Kb sont visibles. Il n'est pas possible de voir des bandes de tailles de 680, 750, 945, 1300 et 1600 Kb (qui étaient aussi déjà des bandes de faible intensité dans le contrôle hydraté) car elles sont masquées par les dommages à l'ADN toujours présents, la faible résolution du gel ou une réparation nouvelle n'utilisant pas tous les fragments homologues (voir discussion) (**Fig. 28**, puits 8).

Après ces expériences d'étude de la restructuration du génome suite à la radiation par protons, nous avons voulu voir s'il était possible, *via* dessiccation, d'avoir assez de dommages pour perdre notre profil de restriction. Pour cela, nous avons repris les échantillons utilisés pour les

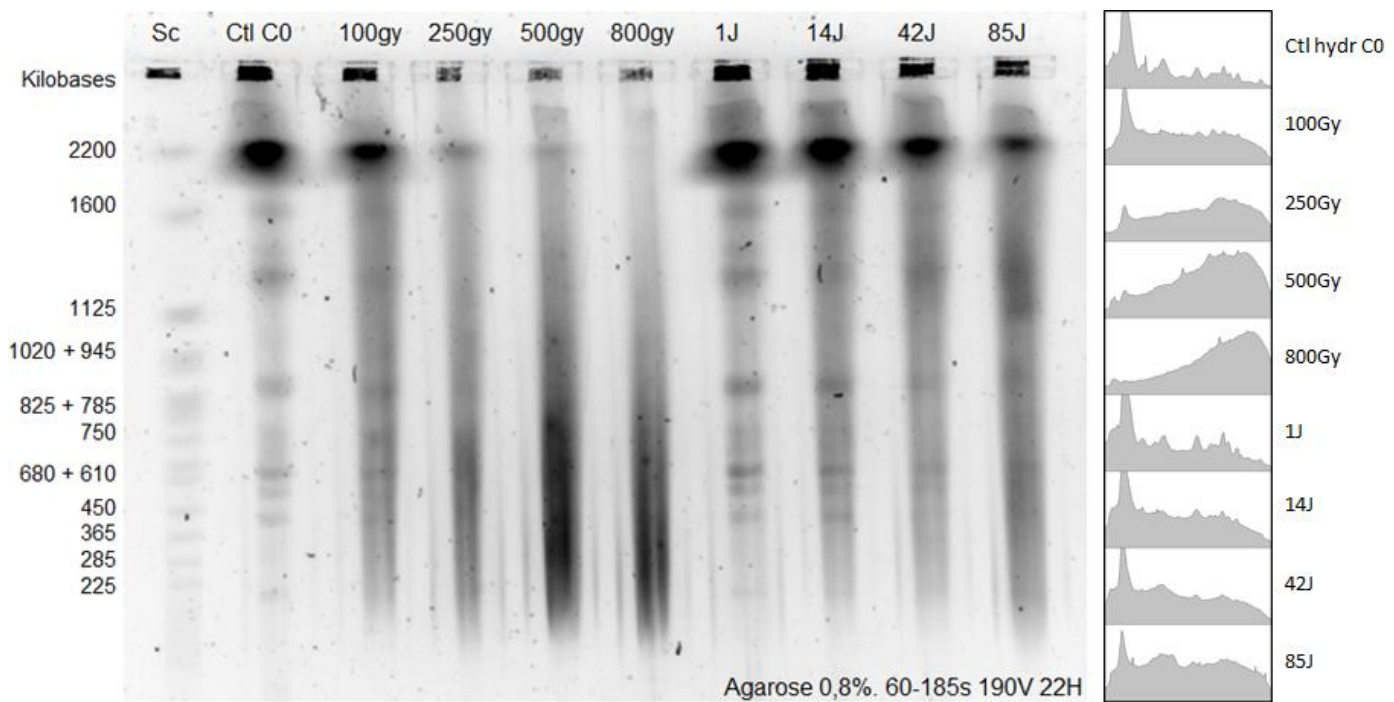


Figure 29 : Visualisation de la restructuration génomique lors d'une cinétique de réparation chez des individus *A. vaga*. Un contrôle « hydratés » (puits 2) a été réalisé. Les puits 3-6 contiennent environ 1000 individus irradiés avec 100, 250, 500 et 800 Gy (protons). Les puits 7-10 contiennent environ 1000 individus desséchés pendant 1, 14, 42 et 85 jours. Tous les plugs ont été traités avec l'enzyme de restriction Not1. Les étalons de poids moléculaire (puits 1 et 9) ont été réalisés avec des chromosomes de *S. cerevisiae*. A droite : quantification des smear (ImageJ).

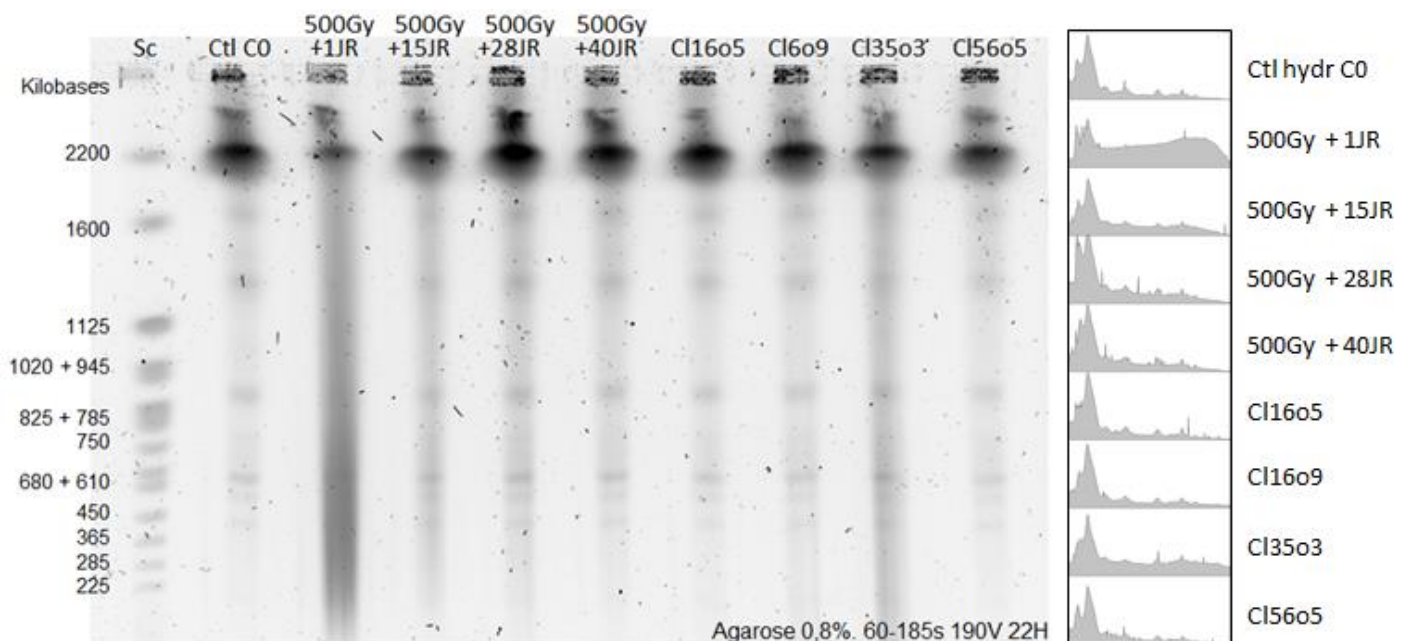


Figure 30 : Visualisation de la restructuration génomique lors d'une cinétique de réparation (puits 3, 4, 5 et 6) chez des individus *A. vaga* irradiés à 500 Gy (protons) ; Visualisation de la structure génomique restreinte chez des individus appartenant à la descendance d'individus mères irradiés à 500 Gy (protons, puits 7, 8, 9 et 10). Un contrôle « hydratés » (puits 2) a été réalisé. Les puits 3-6 contiennent environ 1000 individus irradiés avec 500 Gy (protons) et réhydratés 1, 15, 28 ou 40 jours. Les puits 7-10 contiennent environ 1000 individus appartenant à la descendance de mères irradiées à 500 Gy : puits 7 : descendance de l'œuf 5 de la mère 16 ; puits 8 : descendance de l'œuf 9 de la mère 16 ; puits 9 : descendance de l'œuf 3 de la mère 35 ; puits 10 : descendance de l'œuf 5 de la mère 56. Tous les plugs ont été traités avec l'enzyme de restriction Not1. L'étalon de poids moléculaire (puits 1) a été réalisé avec des chromosomes de *S. cerevisiae*. A droite : quantification des smear (ImageJ).

expériences de Hespeels *et al.* (2014) et nous avons réalisé une PFGE avec ces échantillons contenant 1000 individus *A. vaga* irradiés avec des doses croissantes de radiations par protons (100, 250, 500 et 800 Gy) ou desséchés durant des périodes de plus en plus longues (1, 14, 42 et 85J) (**Fig. 29**).

Le contrôle hydraté montre bien la présence du profil de restriction enzymatique, signe que la restriction a fonctionné (**Fig. 29**, puits 2). Concernant les doses croissantes de radiations par protons, le profil de restriction enzymatique est visible chez les individus irradiés à 100 Gy (**Fig. 29**, puits 3, visibilité des bandes de 365, 500, 610, 750, 825, 1200 et 1600 Kb), mais disparaît déjà chez les individus irradiés à 250 Gy, bien que des zones plus intenses du smear soient présentes aux niveaux auxquels les bandes du profil sont attendues (**Fig. 29**, entre 365 et 750 Kb et entre 825 et 1200 Kb). À 500 Gy et 800 Gy, le profil de restriction enzymatique n'est plus visible soit car les fragments de taille similaire (bandes) ont été dégradés en fragments de tailles variées, soit car les bandes sont masquées par les DSBs (**Fig. 29**, puits 5 et 6). Concernant les différents temps de dessiccation, le profil de restriction enzymatique reste détectable de 1 jour à 42 jours (**Fig. 29**, puits 7-9). Les bandes de 365, 500, 610, 680, 750, 852, 1200, 1300 et 1600 Kb sont visibles chez les individus desséchés 1 et 14 jours (**Fig. 29**, puits 7 et 8). Les bandes de 680 et 750 Kb disparaissent ou sont masquées par les DSBs chez les individus desséchés 42 jours (**Fig. 29**, puits 9) et l'entière des bandes disparaît sous forme de smear chez les individus desséchés 85 jours (**Fig. 29**, puits 10).

Au cours de ce mémoire, nous avons également voulu comparer le profil de restriction génomique reconstruit chez des individus irradiés à 500 Gy (protons) et réhydratés (1, 15 et 28J) avec le profil génomique de la descendance de ces individus irradiés (40J réhydratés = F1). L'étalon de poids moléculaire (**Fig. 30**, puits 1) nous montre que la migration s'est bien déroulée (hormis le fait que les bandes soient de travers) et le contrôle hydraté (**Fig. 30**, puits 2) montre l'apparition du profil de restriction. Au niveau des individus irradiés à 500 Gy et réhydratés 1 jour (**Fig. 30**, puits 3), nous observons un smear entre 225 et 1600 Kb avec une quantité de fragments d'ADN plus importante aux alentours de 450 Kb. Nous observons également une quantité plus faible de fragments d'ADN de taille supérieure à 2200 Kb. Le profil de restriction n'est plus observable chez ces individus, ou est peut-être masqué par les DSBs générées par les radiations (**Fig. 30**, puits 3). Le profil de restriction, identique dans tous les puits (pour toutes les conditions) est de nouveau visible chez les individus irradiés à 500 Gy et réhydratés pendant 15, 28 et 40 jours (**Fig. 30**, puits 4, 5 et 6).

Nous avons également voulu voir si le génome d'individus provenant de générations différentes (œuf différent pondu par une mère irradiée à 500 Gy) possède ou non la même structure génomique. Pour cela, nous avons prélevé l'œuf 5 (**Fig. 30**, puits 7) d'une mère irradiée numérotée « 16 » ainsi que son œuf 9 (**Fig. 30**, puits 8), afin de comparer le profil de restriction génomique entre des sœurs. Nous avons également prélevé l'œuf 3 d'une mère « 35 » (**Fig. 30**, puits 9) et l'œuf 5 d'une mère « 56 » (**Fig. 30**, puits 10) afin de comparer le profil de restriction génomique chez des individus cousines issues de mères différentes ayant été soumises à des radiations de 500 Gy. Les expériences n'ont pas été réalisées sur les œufs en eux-mêmes mais sur la descendance de ces œufs, que nous avons mis en culture afin de développer suffisamment d'individus que pour pouvoir réaliser les plugs d'agarose (1000 individus/plug). Les résultats des puits 7, 8 et 10 semblent similaires aux résultats observés dans le contrôle hydraté (**Fig. 30**, puits 2) puisque nous observons le même profil de restriction. De plus, le profil de restriction enzymatique est bien visible. La descendance de l'œuf 3 de la mère « 35 » (**Fig. 30**, puits 9) semble contenir une plus grande quantité de fragments d'ADN entre 225 et 1600 Kb qui se traduit par une intensité du smear plus élevée (plus de 1000 individus dans le plug ou dommages

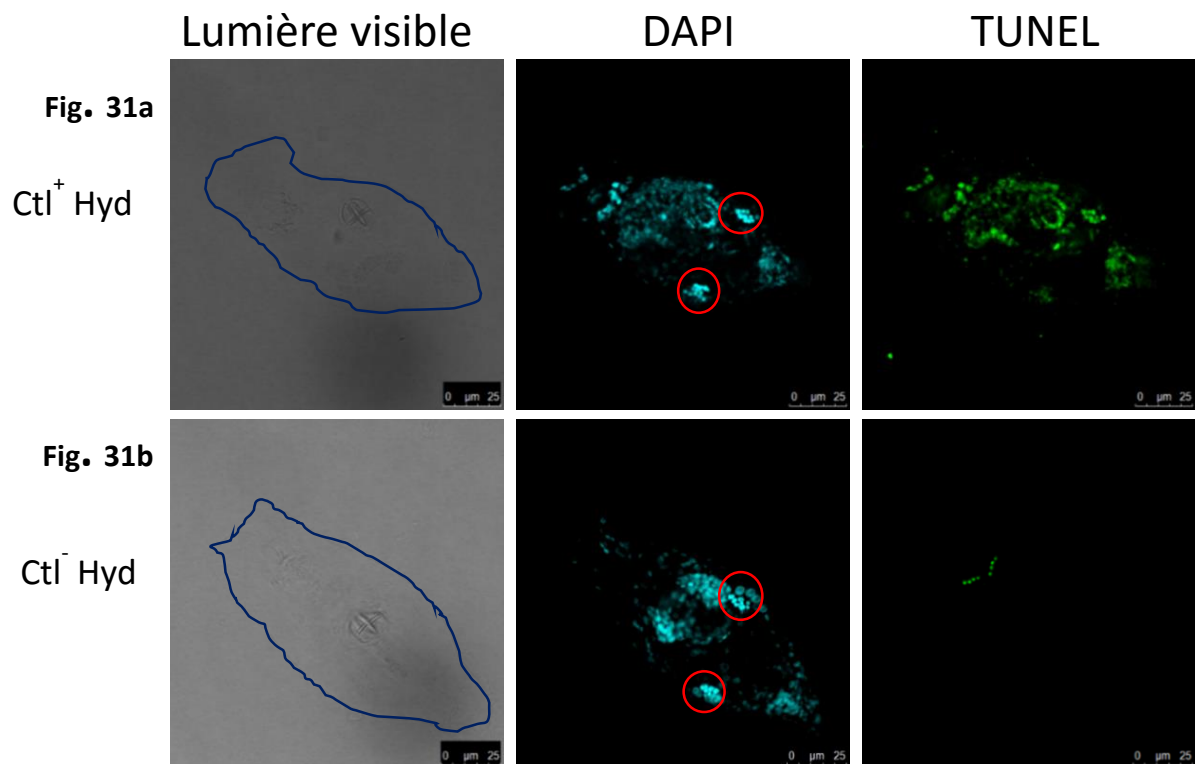


Figure 31 : Visualisation, en microscopie confocale, des cassures d'ADN (SSBs et DSBs) par la méthode du TUNEL chez des individus *A. vaga* hydratés. Les noyaux cellulaires apparaissent en cyan et les cassures d'ADN apparaissent en vert. a : contrôle positif ; b : contrôle négatif.

supplémentaires suite aux traitements ?) que chez les individus des autres puits (**Fig. 30**, puits 7, 8 et 10).

Au cours de ces expériences, nous avons profité de la présence de puits non utilisés pour tester d'autres enzymes de restriction afin de trouver d'autres candidats potentiels qui nous permettraient de valider ou de réfuter les résultats obtenus avec l'enzyme Not1. Nous avons donc coupé l'ADN d'individus hydratés avec l'enzyme Fse1 et l'enzyme Asc1. Nous observons, pour la première enzyme (Fse1, **Fig. 27** puits 9), l'apparition de quelques bandes de très faible intensité, aux alentours de 750, 785 et 1500 Kb. La seconde enzyme (Asc1, **Fig. 28**, puits 10) n'a donné qu'un smear avec des fragments d'ADN de taille comprise entre 225 et 610 Kb environ.

3.3. Visualisation des cassures d'ADN chez des bdelloïdes *A. vaga* hydratés, desséchés et réhydratés par la méthode du TUNEL

Outre les impacts de la dessiccation sur les dommages oxydatifs, nous avons voulu étudier l'évolution des cassures d'ADN chez les individus *A. vaga* lors de la dessiccation, ainsi que leur localisation et leur réparation au cours de la réhydratation. Nous avons donc utilisé la technique du TUNEL, qui est une méthode permettant de marquer (par fluorescence) les cassures d'ADN. Avant toute chose, nous avons dû optimiser/adapter la méthode TUNEL pour pouvoir l'appliquer sur nos individus *A. vaga* étant donné qu'aucun protocole sur des bdelloïdes n'était disponible.

3.3.1. Validation de la méthode TUNEL chez les bdelloïdes *A. vaga*

La première expérience a été réalisée dans le but de tester la technique du TUNEL sur des bdelloïdes *A. vaga*. Pour ces expériences préliminaires, les individus *A. vaga* ont été déposés et « attachés » sur des lames SuperFrost (SuperFrost® Plus, Menzel-Gläser). Afin de valider la méthode TUNEL, un contrôle positif et un contrôle négatif ont été réalisés sur des bdelloïdes hydratés. Le contrôle positif, consistant à traiter les échantillons avec de la DNase, a pour but de vérifier si la réaction enzymatique fonctionne bien lorsque des cassures d'ADN induites sont présentes au sein du génome des bdelloïdes *A. vaga*. Si la réaction enzymatique fonctionne bien en présence de cassures d'ADN, ces dernières sont marquées et nous apparaissent en vert (par fluorescence : $\lambda = 520$ nm). Une contre-coloration au DAPI (marquage de l'ADN des noyaux cellulaires) a également été réalisée afin de vérifier la présence d'individus *A. vaga* sur la lame dans le cas où aucun marquage vert n'est observé (soit le génome des individus ne contient pas de cassures d'ADN = pas de marquage vert, soit les individus ne sont pas restés attachés sur la lame et donc rien n'est visible). De plus, la contre-coloration au DAPI nous permet également de distinguer les cellules somatiques des cellules germinales (les cellules germinales sont regroupées en amas et sont localisées de part et d'autre du tube digestif : **Fig. 31a et 31b**, entourées en rouge). Le contrôle négatif, quant à lui, a pour but de vérifier qu'il n'y a pas de coloration non-spécifique puisque cet échantillon n'est pas traité avec l'enzyme TdT.

Sur les premières images observées au confocal suite à l'expérience TUNEL réalisée, nous observons tout d'abord les individus en lumière visible. Ceux-ci ont une forme plus ou moins allongée selon l'état dans lequel ils étaient lors de la fixation des individus, et nous pouvons apercevoir leur mastax (cercle fendu), situé plus ou moins au centre et à l'avant des individus (au niveau du pharynx), qui nous permet de s'orienter dans le corps des bdelloïdes. Au niveau de la visualisation du marquage DAPI, nous pouvons voir que le marquage est correct et définit assez bien les cellules des bdelloïdes. Les cellules germinales forment des amas de petites cellules de part et d'autre de la partie centrale du corps, et les autres cellules constituent les cellules somatiques et sont surtout observées dans le pied des individus, dans la partie

supérieure du corps (aux alentours du mastax) et dans la tête. Nous pouvons également observer, au même niveau que les amas de cellules germinales, des cellules arrondies et assez grosses appelées « cellules nourricières ». Au niveau de la visualisation du marquage TUNEL du contrôle positif (**Fig. 31a**), nous pouvons voir que le marquage vert observé colocalise avec le marquage DAPI, ce qui signifie que les cellules des individus contiennent bien des cassures d'ADN (marquées en vert *via* l'enzyme TdT) et donc que la réaction enzymatique du TUNEL fonctionne bien en présence de cassures d'ADN induites. Au niveau du contrôle négatif (**Fig. 31b**), aucune coloration non-spécifique n'est observée, hormis quelques cellules faisant partie d'une structure dentée appelée le « râteau à nourriture » dont les bdelloïdes (uniquement de la famille *Adinetidae*) se servent pour capturer leur nourriture (à défaut de pouvoir créer des courants d'eau contenant des particules alimentaires comme les autres bdelloïdes). Ces premières observations nous permettent de dire que la technique du TUNEL peut être appliquée aux bdelloïdes *A. vaga*.

3.3.2. Dommages de l'ADN chez des bdelloïdes hydratés et desséchés

Après avoir validé les contrôles positifs et négatifs, nous avons voulu visualiser les cassures d'ADN chez des individus *A. vaga* hydratés versus desséchés pendant 42 jours. Nous observons très peu de cassures d'ADN dans les bdelloïdes hydratés (surtout du bruit de fond, **Fig. 32c**), alors que les bdelloïdes desséchés 42 jours montrent un marquage vert assez prononcé au niveau de l'ensemble du corps des organismes, ce qui signifie qu'ils contiennent de nombreuses cassures d'ADN (**Fig. 32f**). Les contrôles positifs et négatifs des deux conditions sont corrects (**Fig. 32a, b, d et e**). Les DSBs induites lors de la dessiccation sont donc bien visibles par la technique du TUNEL chez les bdelloïdes. Notons que le marquage au DAPI n'a pas été réalisé lors de cette expérience.

3.3.3. Optimisation de la méthode TUNEL dans le but d'obtenir un marquage des individus homogène et d'assurer une perméabilisation adéquate

Nous remarquons dans les expériences précédentes que les marquages sont hétérogènes, ce qui suggère que les réactifs n'agissent pas partout sur la lame (communication personnelle, C. Demazy). En effet, les bdelloïdes ont tendance à former des groupes sur la lame et les gouttes de réactifs sont déposées sans pouvoir assurer que chaque goutte d'un réactif différent va couvrir la même surface de la lame (surface trop grande). Nous avons donc décidé de refaire l'expérience TUNEL en fixant les bdelloïdes sur des coverslips, présentant une surface plus réduite et placés dans une plaque de culture cellulaire 24 puits. Ce processus garantit l'exposition de l'ensemble des rotifères présents sur les coverslips aux différents produits de réaction. Nous avons également voulu comparer (ctl+, ctl- et tests TUNEL) deux méthodes de perméabilisation : (1) le tampon citrate, le micro-ondes et la protéinase K et (2) le PBS-Triton X-100 1 %. Nous avons voulu trouver une alternative de perméabilisation car le traitement au micro-ondes faisait bouillir et évaporer le tampon citrate déposé sur les coverslips. Cette comparaison de méthodes nous a donc permis de vérifier si le traitement au micro-ondes n'était pas trop agressif pour les bdelloïdes et si le PBS-Triton X-100 1 %, moins agressif, était efficace ou non pour perméabiliser les membranes de nos individus. Pour ces deux méthodes, les contrôles positifs (**Fig. 33a et 33b**) ont donné des résultats mitigés puisque certaines cellules marquées au DAPI sont également marquées en vert (colocalisation, présence de DSBs marquées en vert dans les noyaux cellulaires) alors que certains marquages verts ne colocalisent pas avec le marquage DAPI et ne semblent donc pas présents dans des cellules des individus (bruit de fond).

Les deux méthodes ont également été testées sur des bdelloïdes hydratés, afin de vérifier que les deux méthodes de perméabilisation n'induisent pas de cassures d'ADN. Les résultats ont montré, pour les deux méthodes, une absence de marquage vert, exceptés quelques bruits de fond (**Fig. 33e et 33f**) mais le marquage vert dans la condition PBS-Triton X-100 1 % est surtout situé au niveau de la périphérie du corps (épiderme) des bdelloïdes (**Fig. 33f**) et n'est donc pas considéré comme « significatif » puisqu'il ne marque pas les noyaux cellulaires (ne met pas en évidence les DSBs).

3.3.4. Optimisation de la méthode TUNEL dans le but d'étudier la réparation de l'ADN chez les individus *A. vaga* desséchés.

L'expérience que nous voulions réaliser est un suivi des cassures d'ADN durant une cinétique de réhydratation (réparation) chez des individus *A. vaga* soumis à une dessiccation prolongée, dans le but de vérifier si toutes les cellules (somatiques et germinales) des organismes sont affectées de la même manière par la réparation de l'ADN. Cette expérience pouvait être réalisée de deux manières : *via* une cinétique de réparation croissante ou décroissante (cinétique inverse).

La cinétique de réparation croissante (**Fig. 34**) présente l'avantage de pouvoir travailler à partir d'un même pool d'individus *A. vaga* et de pouvoir réaliser une même dessiccation pour toutes les conditions de réhydratation (tous les individus des différentes conditions sont placés dans la chambre climatique en même temps). Cela implique cependant la conservation des premiers échantillons réalisés (desséchés 14J et réhydratés 2H, 8H et 1J) jusqu'à la fin de la réhydratation de la dernière condition (réhydratés 6J). En effet, si nous voulons pouvoir comparer les résultats obtenus pour les différentes conditions de réhydratation, nous devons réaliser les tests TUNEL sur tous les échantillons, au cours de la même réaction (et mêmes conditions de travail).

La cinétique de réparation inverse (**Fig. 35**), quant à elle, présente l'inconvénient de ne pas pouvoir travailler à partir d'un même pool d'individus *A. vaga* et de ne pas pouvoir soumettre les individus des différentes conditions à la même dessiccation puisqu'ils seraient placés dans la chambre climatique à des temps différents. Cependant, cette méthode nous permettrait de ne pas devoir conserver les échantillons puisque tous les échantillons seraient traités en même temps à la fin de la réhydratation (**Fig. 35**). La réaction TUNEL pourrait donc se réaliser sur tous les échantillons en même temps, dès qu'ils auraient tous terminé leur réhydratation.

Dans ce mémoire, nous avons voulu commencer par tester le protocole de cinétique de réparation croissante (**Fig. 34**) et nous avons donc d'abord tenté de trouver une méthode de conservation n'induisant pas de cassures d'ADN dans nos échantillons, afin de ne pas fausser nos tests. Nous avons donc tenté la conservation dans de l'éthanol 70 et 100 % à -20°C ainsi que dans du PBS 1x à 4°C. Les résultats pour la conservation dans l'éthanol (7 jours à -20°C) ainsi que dans le PBS (14 jours à 4°C) montraient la présence de nombreuses cassures d'ADN (voir Annexes). Par après, des expériences similaires ont été réalisées avec des individus hydratés frais (récolte du jour) *vs* stockés dans du PBS 1x pendant 6 jours à 4°C (**Fig. 36**). Au niveau des bdelloïdes « frais » (récolte du jour), le contrôle positif montre un signal fluorescent assez prononcé et visible mais ce dernier ne semble pas toujours colocaliser parfaitement avec le marquage DAPI puisque la coloration « cyan » de certaines cellules semble rester intacte (la coloration des cellules à proximité du mastax, des cellules germinales ainsi que de quelques cellules situées au niveau du pied est toujours bien cyan, **Fig. 36a**), signifiant que le contrôle positif n'a pas fonctionné correctement. Concernant le test TUNEL, nous n'observons que quelques spots fluorescents, la plupart étant situés hors du corps des bdelloïdes, pouvant donc être qualifiés comme bruit de fond (**Fig. 36b**). Concernant les bdelloïdes conservés pendant 6 jours dans le PBS à 4°C, le contrôle positif montre également un signal fluorescent

assez prononcé et visible dans la majorité des cellules internes des individus, bien que plus diffus et pas toujours colocalisé non plus avec le marquage DAPI (**Fig. 36c**). Quant au test TUNEL (visualisation des DSBs présentes chez les individus *A. vaga* et non induites par la DNase), nous n'observons presque pas de spots fluorescents (**Fig. 36d**), ce qui pourrait signifier que la méthode de conservation en PBS pendant 6 jours n'induit pas de cassures d'ADN si nous sommes sûrs que les contrôles positifs sont bien positifs, ce qui n'est pas le cas ici.

3.3.5. Visualisation de la réparation de l'ADN dans les cellules somatiques vs. germinales des bdelloïdes *A. vaga*

Nous avons décidé de réaliser une cinétique inverse de réparation (**Fig. 35 et 37**) afin d'éviter l'étape de conservation des échantillons, celle-ci ne donnant pas de résultats satisfaisants. Nous avons donc desséché des individus *A. vaga* pendant 14 jours puis nous les avons réhydratés pendant 2 heures à 6 jours, en commençant par le temps de réhydratation le plus long. Nous avons également réalisé un contrôle avec des bdelloïdes desséchés 1 jour et réhydratés 2 heures et avec des bdelloïdes desséchés 21 jours et réhydratés 2 heures, afin d'observer l'évolution des cassures d'ADN avec le temps passé en dessiccation.

Le contrôle positif n'a pas fonctionné (**Fig. 37a**) puisque le marquage vert fluorescent est présent uniquement sur la périphérie (épiderme) des individus, ce qui signifie que la perméabilisation membranaire n'a pas fonctionné. De ce fait, les résultats des tests TUNEL ne peuvent pas être interprétés (pas de contrôle comparatif). De plus, la réaction TUNEL ne semble pas avoir fonctionné pour les échantillons des tests TUNEL (notons cependant que le marquage au DAPI a bien fonctionné).

En effet, les images obtenues pour la réhydratation de 2 heures après la dessiccation de 14 jours ne montrent que quelques spots fluorescents, probablement du bruit de fond car ils ne sont pas colocalisés avec le marquage DAPI (**Fig. 37e**). Les individus desséchés 14 jours et réhydratés 8 heures semblent contenir plus de spots fluorescents, mais ces derniers ne semblent pas colocalisés avec les cellules des individus (**Fig. 37f**) et seraient donc également du bruit de fond. Les images obtenues pour le test TUNEL des individus desséchés 14 jours et réhydratés 24 heures et 6 jours ne montrent également que du bruit de fond (**Fig. 37g et 37i**). Enfin, le contrôle positif réalisé sur les individus desséchés 14 jours et réhydratés 24 heures (**Fig. 37h**) montre un résultat mitigé puisque certains spots verts semblent colocalisés avec le marquage DAPI (DSBs marquées en vert) alors que d'autres spots verts ne semblent pas colocalisés avec les cellules des individus (bruit de fond). De plus, nous retrouvons des « tâches vertes » (**Fig. 37h**) autour des individus, représentant probablement les réactifs n'ayant pas pénétré le corps des bdelloïdes, ce qui signifie que la perméabilisation est mauvaise.

3.3.6. Visualisation de l'évolution des cassures d'ADN avec le temps passé en dessiccation chez des individus *A. vaga*

Afin de voir à partir de quand les cassures d'ADN sont visibles chez les individus lors de la dessiccation, et afin de retester la perméabilisation des individus, nous avons réalisé une cinétique de dessiccation (1, 7, 14 et 21 jours) sur des individus *A. vaga* (**Fig. 38**). Les contrôles positifs réalisés sur les individus hydratés (**Fig. 38a**) et sur les individus desséchés 7 jours réhydratés 5 heures (**Fig. 38f**) montrent une colocalisation du marquage vert avec le marquage DAPI mais il semble également y avoir la présence de spots verts non colocalisés avec le marquage DAPI (bruit de fond). Les réactifs du TUNEL semblent cependant ne pas avoir pénétré correctement les membranes externes des individus (**Fig. 38f**) puisque tout l'épiderme des bdelloïdes desséchés 7 jours (ctl+) est marqué et nous retrouvons des « tâches » vertes hors du corps des individus. Les contrôles négatifs réalisés sur les individus hydratés (**Fig. 38b**) et

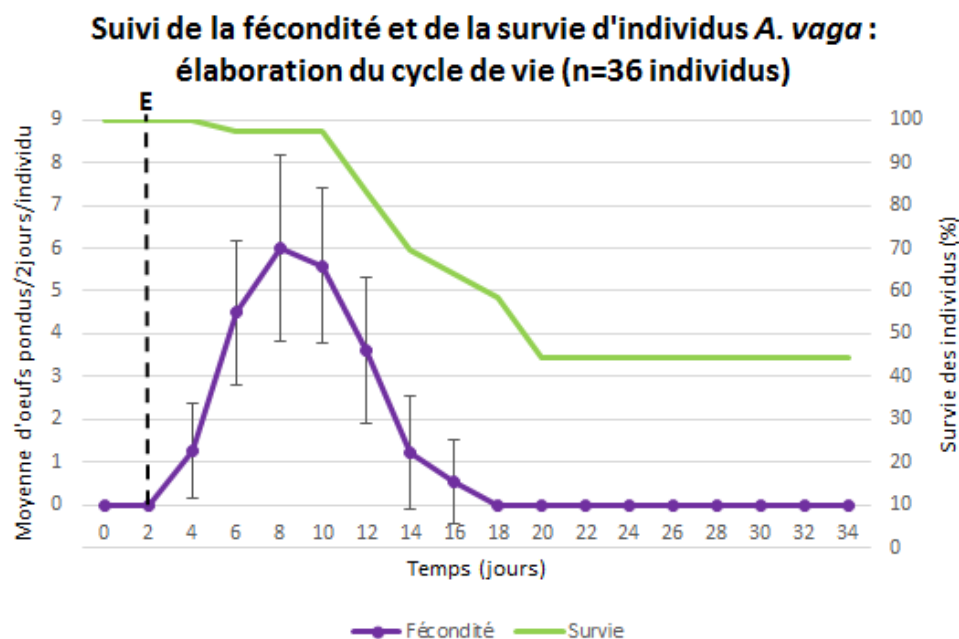


Figure 39 : Cycle de vie des bdelloïdes *A. vaga* : suivi de la fécondité et de la survie des individus. L'expérience a été réalisée sur 36 individus et les œufs ont été comptés et prélevés tous les deux jours. Chaque point de la courbe de fécondité représente la moyenne (sur 36 individus) du nombre d'œufs pondus par individu, tous les deux jours. Les écarts-types sont représentés pour chaque point. E = éclosion.

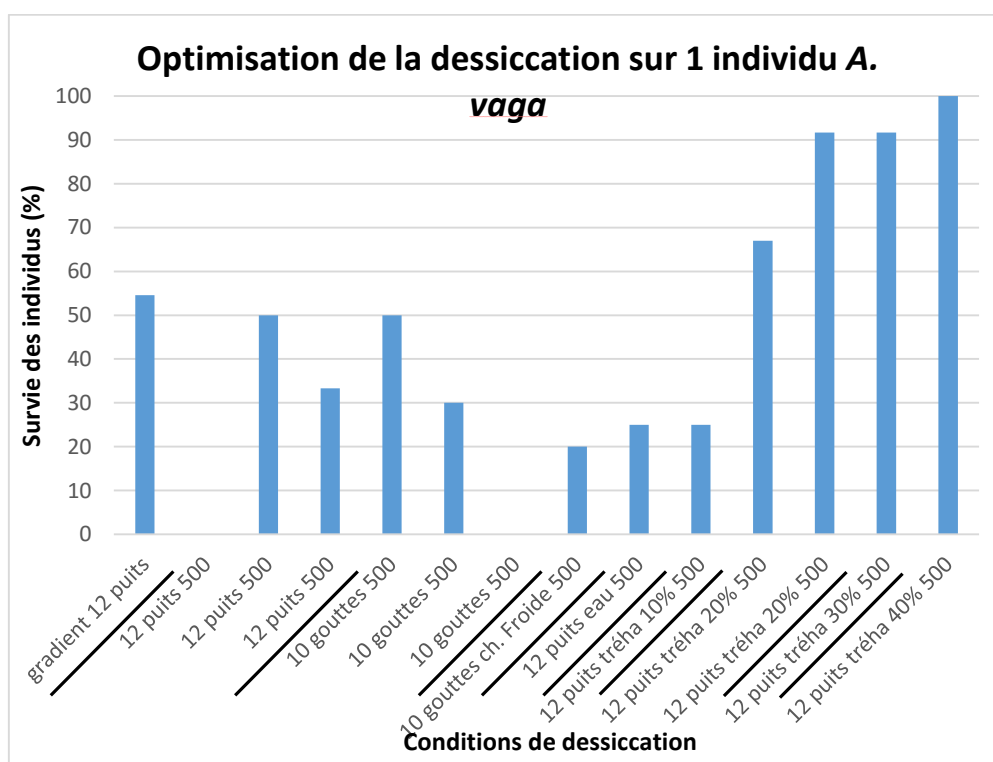


Figure 40 : Optimisation de la dessiccation sur 1 individu *A. vaga* : détermination du taux de survie pour chaque condition de dessiccation testée. Gradient 12 puits : 2 mL, 1 mL, 750 µL et 500 µL d'agarose LMP 3%, respectivement dans chacune des 4 colonnes ; 12 puits 500 : 500 µL d'agarose LMP 3% dans chaque puits ; 10 gouttes 500 : 10 gouttes de 500 µL d'agarose LMP 3% disposées sur une boîte de Petri moyenne ; 10 gouttes ch. Froide 500 : 10 gouttes de 500 µL d'agarose LMP 3% disposées sur une boîte de Petri moyenne mise en dessiccation en chambre froide ; 12 puits eau 500 : 500 µL d'agarose LMP 3% dans chaque puits avec les individus déposés dans 40 µL d'eau ; 12 puits tréha 10% 500 : 500 µL d'agarose LMP 3% dans chaque puits avec les individus déposés dans 20 µL d'eau + 20 µL de solution de tréhalose 10% ; 12 puits tréha 20% 500 : 500 µL d'agarose LMP 3% dans chaque puits avec les individus déposés dans 20 µL d'eau + 20 µL de solution de tréhalose 20% ; 12 puits tréha 30% 500 : 500 µL d'agarose LMP 3% dans chaque puits avec les individus déposés dans 20 µL d'eau + 20 µL de solution de tréhalose 30% ; 12 puits tréha 40% 500 : 500 µL d'agarose LMP 3% dans chaque puits avec les individus déposés dans 20 µL d'eau + 20 µL de solution de tréhalose 40%.

sur les individus desséchés 7 jours rehydratés 5 heures (**Fig. 38g**) ne montrent aucun marquage vert, excepté les cellules situées à proximité de la bouche. Le test TUNEL sur les individus hydratés ne montre aucun signal fluorescent vert (**Fig. 38c**), comme nous l'attendions. Les tests TUNEL réalisés sur les individus desséchés 1, 7, 14 et 21 jours et réhydratés 5 heures (**Fig. 38d, e, h et i**) montrent la présence de quelques spots vert fluorescent n'étant pas colocalisés avec les cellules des individus et étant donc probablement du bruit de fond.

3.4. Étude du cycle de vie des bdelloïdes *A. vaga* et des impacts de la dessiccation sur le fitness des individus

3.4.1. Élaboration du cycle de vie des bdelloïdes *A. vaga* en conditions de laboratoire

Au cours de ce mémoire, nous avons réalisé des cycles de vie des individus *A. vaga* et estimé leur taux de reproduction en conditions de laboratoire afin de pouvoir étudier les impacts que peut avoir la dessiccation sur ce cycle de vie. Nous avons donc réalisé une expérience « cycle de vie » au cours de laquelle des individus isolés ont été suivis jour après jour (prélèvement manuel des œufs pondus par les individus de départ = « mères » dans chaque puits) depuis leur éclosion jusqu'à leur mort.

En réalisant une moyenne du nombre d'œufs pondus par jour et par individu, nous avons ainsi pu tracer une courbe de fécondité de nos individus (n=36). Au cours de ce cycle de vie, la survie des individus hydratés a également été calculée et reportée sur le graphique et nous permet d'avoir une information sur la durée de vie des bdelloïdes *A. vaga* en conditions de laboratoire. Les individus *A. vaga* (œufs) ont été isolés dans des puits un par un au jour 0 et ont éclos au jour 2 (E : éclosion). Si nous regardons, dans un premier temps, la courbe de fécondité des individus (**Fig. 39**), nous pouvons voir que les premiers œufs sont pondus 2 jours après l'éclosion (également le cas dans les cycles de vie **Fig. 41 et 43**) et nous observons une augmentation progressive de la moyenne des œufs pondus par individu tous les deux jours, jusqu'à l'atteinte d'un pic de fécondité 6 jours après l'éclosion des individus, avec un maximum de 6,00 œufs pondus en moyenne en 2 jours par individu (max. 9 œufs pondus en 2 jours pour 1 individu). Au-delà de ce temps, la courbe de fécondité diminue progressivement et les individus pondent leurs derniers œufs 14 ou 15 jours après avoir éclos, ce qui fait que la courbe de fécondité s'annule 16 jours après l'éclosion des individus (**Fig. 39**). Si nous regardons la courbe de survie en parallèle (**Fig. 39**), celle-ci chute rapidement au cours de l'effort reproductif (pic de ponte, 97,22 % → 69,44 % de survie) et également lors de la diminution de la ponte des œufs. Après les 16 jours de vie des individus, lorsque la courbe de fécondité s'annule, nous pouvons voir (**Fig. 39**) qu'un peu plus de 40 % des individus de départ sont toujours en vie. De plus, ces 40 % d'individus restent en vie pendant encore 16 jours au minimum, alors même qu'ils ne pondent plus aucun œuf. Nous nous sommes donc demandé dans quel but ces individus vivaient autant de temps sans pondre. En accord avec cette question et après avoir observé une majorité d'individus isolés pondre à nouveau après nos expériences préalables de dessiccation, nous avons pensé que la dessiccation pourrait peut-être induire une réactivation du mécanisme de ponte. Les cycles de vie réalisés dans l'expérience suivante (**Fig. 41 et 43**) montrent que la courbe de fécondité peut avoir des allures différentes selon le pool d'individus prélevés mais tout de même garder la même tendance. En effet, dans la **Fig. 39**, la courbe de fécondité augmente pour ensuite redescendre et forme ainsi un pic bien défini. Au niveau des **Fig. 41 et 43**, les courbes de fécondité sont également croissantes puis décroissantes mais forment plusieurs pics, avec un pic maximum à 9 (3,24 œufs pondus/individu/jour) et 12 jours (4,16 œufs pondus/individu/jour) respectivement (**Fig. 41 et 43**), ainsi qu'un pic secondaire à 8 jours (2,8 et 2,75 œufs pondus/individu/jour respectivement, **Fig. 41 et 43**).

3.4.2. Optimisation de la dessiccation sur 1 individu *A. vaga*

Le prochain but de ce mémoire était de mettre en dessiccation les individus sénescents du cycle de vie (ne pondant plus) dans le but d'observer une éventuelle reprise de la ponte après la dessiccation. Les protocoles précédemment publiés de dessiccation se réalisant sur de gros pools d'individus (plus de 10000), il nous a fallu adapter ce protocole de dessiccation à des individus isolés, ces derniers montrant une survie à la dessiccation bien moindre par rapport aux individus en groupes (cf. Hespeels *et al.*, 2014). Nous avons donc tenté d'optimiser la survie des bdelloïdes lors de dessiccations de 1 jour sur des individus isolés. Pour cela, nous avons fait varier les types de support sur lesquels a été coulé l'agarose où les individus à dessécher ont été déposés. Nous avons également fait varier les quantités d'agarose ajoutées sur les supports.

Nous avons commencé par tester plusieurs volumes d'agarose dans une même plaque de culture 12 puits et nous avons donc coulé 2 mL d'agarose dans la première colonne de la plaque (3 puits/colonne), 1 mL dans la deuxième, 750 μ L dans la troisième et 500 μ L dans la dernière. Nous avons obtenu (**Fig. 40**) 54,54 % de survie au niveau de l'entièreté de la plaque (n=12), mais cela n'était pas suffisant pour l'expérience à réaliser, puisque nous réalisons le cycle de vie sur un nombre limité d'individus. Nous avons donc besoin d'obtenir un maximum de survie suite à la dessiccation des individus isolés et nous avons continué à chercher une méthode amenant un taux de survie plus élevé. La survie des individus pour le gradient d'agarose ayant été plus élevée sur les volumes d'agarose de 500 μ L, nous avons retenté la même expérience qu'avant, avec 500 μ L d'agarose dans tous les puits. Les résultats ont montré une survie de 0, 33,33 et 50 % (**Fig. 40**). Nous avons ensuite déposé des gouttes de 500 μ L d'agarose sur des boîtes de Petri de taille moyenne (10 gouttes/boîte) mais la survie observée suite à la dessiccation n'a été que de 0, 30 et 50 % (**Fig. 40**). Nous avons également tenté de réaliser la dessiccation dans une pièce où l'humidité relative et la température sont contrôlées (chambre froide : paramètres moins contrôlés que dans la chambre climatique) mais les résultats ont montré une survie de 20 % seulement (**Fig. 40**).

Nous avons ensuite mis en dessiccation (1J) des individus isolés sur lesquels nous avons ajouté des solutions de tréhalose de différentes concentrations (0%, 10 % et 20%) afin d'essayer de « booster » et de protéger nos individus isolés. Cette expérience a été réalisée sur 96 individus au total, avec 24 individus pour la solution de tréhalose 10 %, 24 individus pour la solution de tréhalose 20 % et 48 individus pour la solution de tréhalose 0 %. Les résultats pour les individus « tréhalose 0 % » sont similaires aux résultats obtenus précédemment sans ajout de tréhalose (**Fig. 40**, 25 % de survie), ainsi qu'aux résultats obtenus pour les individus dans la solution de tréhalose 10 % (**Fig. 40**, 25 % de survie). Par contre, les résultats pour les individus dans la solution de tréhalose 20 % montrent une nette augmentation de la survie, celle-ci atteignant 67 % (**Fig. 40**). Au vu de ces résultats, nous avons décidé de retenter l'expérience en augmentant la concentration en tréhalose. Nous avons donc mis en dessiccation des individus isolés en leur ajoutant une solution de tréhalose 20 %, 30 % ou 40 %, avec 12 individus par condition. Les résultats pour le tréhalose 20 % sont supérieurs au 67 % de survie obtenus précédemment, et sont similaires aux résultats pour le tréhalose 30 % (**Fig. 40**, 91,67 % de survie). Les résultats obtenus pour les individus desséchés avec la solution de tréhalose 40 % montrent un taux de survie de 100 % après 1 jour de dessiccation (**Fig. 40**).

3.4.3. Dessiccation sur 1 individu des bdelloïdes *A. vaga* du cycle de vie et suivi d'une éventuelle réactivation de la ponte

Après avoir mis au point un protocole de dessiccation sur 1 individu, nous avons relancé un cycle de vie avec des individus *A. vaga*. Comme l'expérience précédente (cf. 3.4.1), nous avons suivi ces individus jour après jour depuis leur éclosion, mais nous ne les avons pas gardé jusqu'à leur mort. En effet, après avoir attendu quelques jours après l'arrêt de la ponte des individus (19 jours après leur éclosion, **Fig. 41**), nous avons prélevé chacun d'entre eux et les avons déposé délicatement un par un dans des puits contenant 500 μ L d'agarose. Nous avons ajouté la solution de tréhalose 40 % puis les avons mis en dessiccation durant 1 jour.

Sur 21 individus *A. vaga* sénescents, seuls 3 d'entre eux se sont réveillés après la dessiccation (**Fig. 42**) et aucun d'entre eux n'a pondu durant les 3 jours qu'ils ont vécus après leur réhydratation (**Fig. 42**). Par ailleurs, si nous regardons la courbe de survie correspondant à ce cycle de vie, nous observons une forte chute de la survie (**Fig. 42**), celle-ci passant de 100 % à presque 40 % au moment de mettre les individus en dessiccation. Il est également important de notifier que nous avons dû faire face à une contamination bactérienne lors de ce cycle de vie, ce qui explique probablement la diminution de la survie.

Nous avons donc décidé de recommencer cette expérience et nous avons relancé un nouveau cycle de vie, en prenant soin de toujours bien travailler en conditions stériles. Cette fois-ci, nous n'avons pas eu de contamination bactérienne, et la courbe de survie des individus a très faiblement chuté, passant de 100 % à environ 90 % de survie au moment de la mise en dessiccation des individus (22 jours après l'éclosion, **Fig. 43**). Cependant, après 22 jours de vie des individus *A. vaga*, 14 individus sur les 30 restants au moment de la mise en dessiccation avaient encore pondu très récemment. L'expérience consiste cependant à mettre en dessiccation des individus dont nous sommes sûrs qu'ils ont stoppé leur ponte. Comme nous savons que la survie à la dessiccation diminue aussi avec l'âge des individus¹⁵, nous avons décidé de lancer la dessiccation en distinguant les individus sénescents (n'ayant pas pondu durant les 3 jours précédant la dessiccation : 53,33 %) et ceux qui étaient susceptibles de ne pas encore être sénescents (ayant pondu au moins 1 œuf durant les 3 jours précédant la dessiccation : 46,67 %).

Après 1 jour de dessiccation, 86,87 % des individus isolés se sont réveillés (**Fig. 42**, 26 individus réveillés sur 30 individus desséchés). Sur les 53,33 % d'individus sénescents avant la dessiccation, aucun d'entre eux n'a pondu après s'être réveillé, alors que sur les 46,67 % d'individus possiblement non sénescents avant la dessiccation, 35,71 % d'entre eux ont pondu entre 1 et 4 œufs après s'être réveillés (**Fig. 42**).

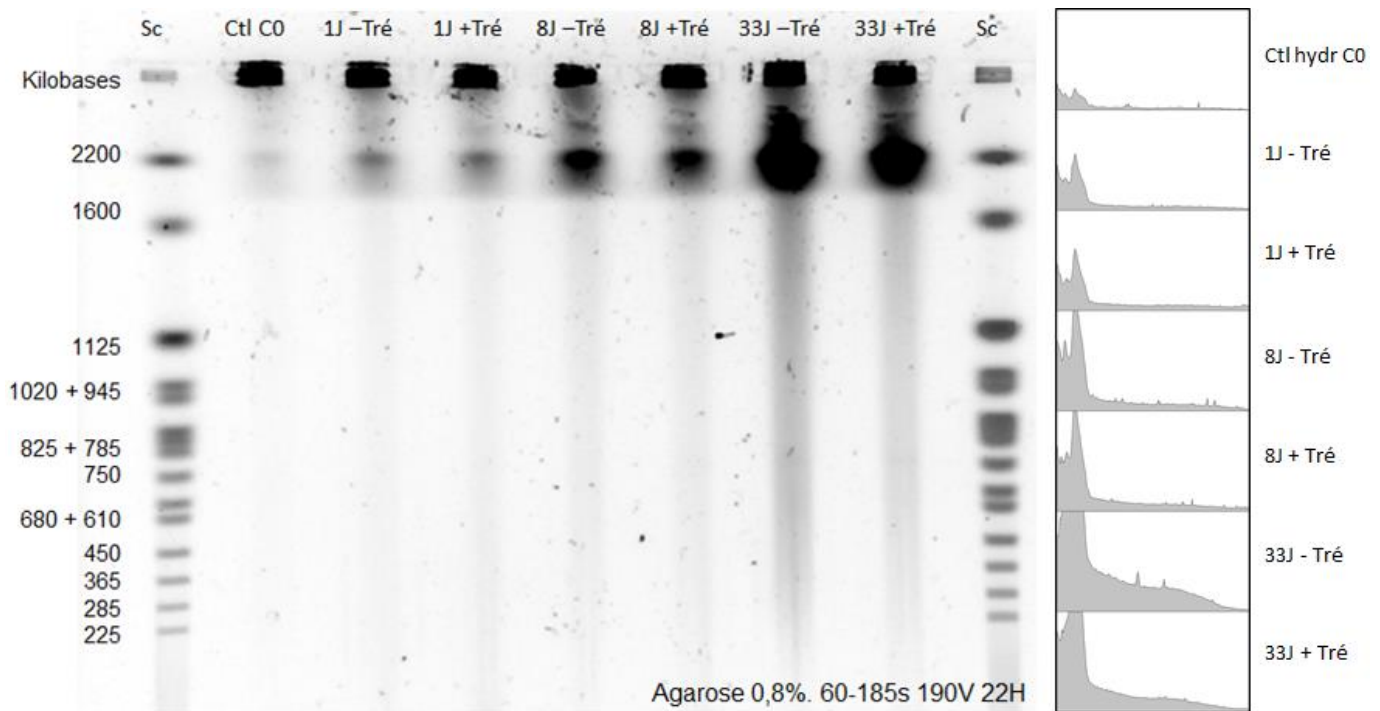


Figure 44 : Visualisation de l'intégrité génomique lors d'une cinétique de dessiccation chez des individus *A. vaga* en présence ou non de tréhalose extracellulaire. Un contrôle « hydratés » (puits 2) a été réalisé. Chaque puits (puits 3-8) contient environ 1000 individus desséchés de 1 à 33 jours. Les puits 3, 5 et 7 contiennent des individus desséchés en absence de tréhalose. Les puits 4, 6 et 8 contiennent des individus desséchés en présence de tréhalose. Les étalons de poids moléculaire (puits 1 et 9) ont été réalisés avec des chromosomes de *S. cerevisiae*. A droite : quantification des smear (ImageJ).

3.5. Visualisation d'un éventuel effet protecteur du tréhalose au niveau de l'intégrité génomique des individus *A. vaga* au cours d'une dessiccation

Après avoir observé une augmentation de la survie des individus isolés suite à l'ajout de solution de tréhalose, nous nous sommes demandé si le tréhalose pourrait avoir un effet protecteur contre la formation de DSBs au cours de la dessiccation. Pour cela, après la récolte des individus *A. vaga* par centrifugation, nous avons resuspendu les culots soit dans de l'eau soit dans une solution de tréhalose 40 %, avant de déposer les individus sur les boîtes d'agarose dans la chambre climatique. Après 1 jour, 8 jours et 33 jours de dessiccation, les plugs de 1000 individus chacun ont été réalisés pour chaque condition et ont été traités afin de faire migrer l'ADN des individus de chaque condition dans un gel d'agarose lors d'une PFGE. La cinétique de dessiccation (1, 8 et 33 jours) est représentée sur le gel, avec pour chaque condition, des individus « sans tréhalose » et « avec tréhalose » en vis-à-vis (**Fig. 44**, puits 3-8). Un contrôle hydraté a également été réalisé (**Fig. 44**, puits 2). Ce contrôle ne semble contenir aucune cassure d'ADN, ou très peu. Les individus desséchés 1 jour « sans » et « avec » tréhalose (**Fig. 44**, puits 3 et 4 respectivement) contiennent tous deux quelques fragments d'ADN supérieur à 2200 Kb mais aucune différence n'est visible entre les deux. Au niveau des individus desséchés 8 jours « sans » et « avec » tréhalose (**Fig. 44**, puits 5 et 6 respectivement), nous observons une augmentation d'intensité au niveau des fragments d'ADN d'environ 2200 Kb par rapport aux individus desséchés 1 jour. De plus, un léger smear commence à apparaître (**Fig. 44**, puits 5 et 6). Une légère différence d'intensité entre les deux conditions est observée au niveau des fragments d'ADN d'environ 2200 Kb, avec une intensité légèrement plus élevée chez les individus « sans tréhalose ». Les individus desséchés 33 jours présentent plus de DSBs étant donné que le « patch » noir, représentant les fragments d'ADN d'environ 2200 Kb, est plus intense (**Fig. 44**, puits 7 et 8) que dans les autres conditions de dessiccation (1 jour et 8 jours) et que le smear représentant les fragments d'ADN de tailles comprises entre 225 et 1600 Kb est également plus intense (**Fig. 44**, puits 7 et 8) que le smear des conditions précédentes. Enfin, nous observons que, quelle que soit la taille des fragments d'ADN, les différentes zones du smear sont plus intenses chez les individus « sans tréhalose » que chez les individus « avec tréhalose » (**Fig. 44**, puits 7 et 8), ce qui signifie que les DSBs sont plus nombreuses chez les individus ayant été desséchés sans tréhalose.

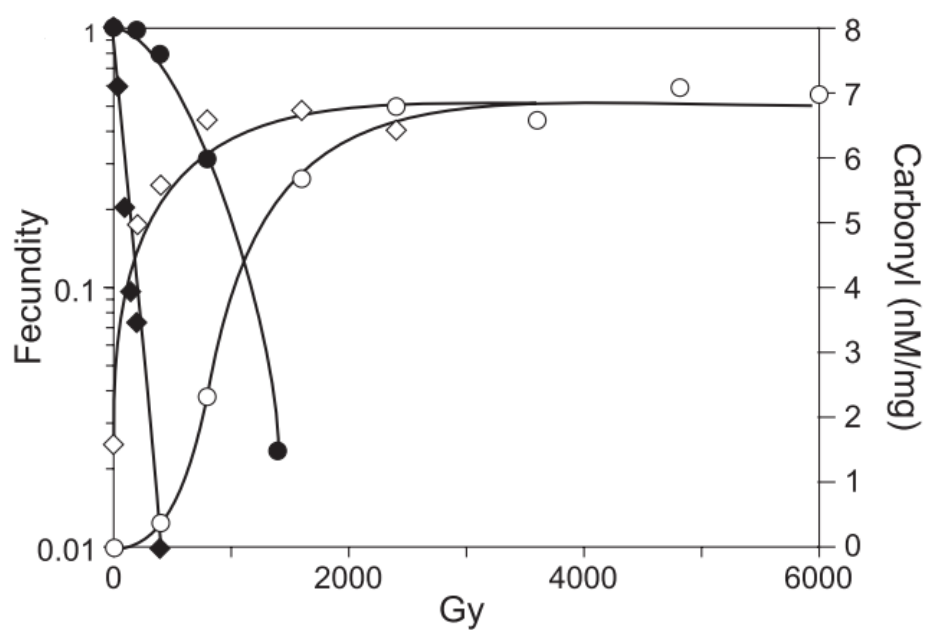


Figure 45 : Courbe dose-réponse de la fécondité et du taux de carbonylation protéique mesuré par la technique ELISA. Les individus *A. vanga* sont représentés par des cercles et les individus *C. elegans* sont représentés par des triangles. Krisko, Leroy, Radman *et al.*, 2012.

4. Discussions

4.1. Étude des dommages oxydatifs chez des bdelloïdes *A. vaga* hydratés, desséchés et réhydratés

Le génome du bdelloïde *A. vaga*, notre organisme modèle au laboratoire, est caractérisé par un nombre important de gènes impliqués dans les réponses au stress oxydatif, notamment les antioxydants⁴⁸. Il a également été démontré expérimentalement, chez les rotifères bdelloïdes, que l'accumulation de dommages oxydatifs au niveau des protéines induite par des radiations ionisantes était freinée, suggérant ainsi la présence d'un système antioxydant perfectionné. En effet, l'équipe du Prof. Miro Radman a montré que l'augmentation des dommages oxydatifs (carbonylation protéique) se réalise plus lentement (phase de lag en-dessous de 400 Gy, **Fig. 45**) chez les individus bdelloïdes *A. vaga* que chez *C. elegans* lors de l'augmentation des doses de radiations. Les antioxydants joueraient donc le rôle de tampon protecteur en « scavengant » les ROS induits par les radiations ionisantes⁵⁶. Nous avons vu dans l'introduction que la dessiccation engendre aussi des dommages oxydatifs et nous nous demandons comment les bdelloïdes gèrent ces dommages. Il a été montré qu'une dessiccation prolongée diminuait la survie des individus *A. vaga* et Hespeels *et al.* ont d'abord pensé que cela pouvait être dû à une accumulation des DSBs avec le temps de dessiccation, mais leurs expériences ont démontré que la survie des individus n'était pas liée à leur intégrité génomique⁸. Comme les expériences de Krisko *et al.*⁵⁶ ont montré que les antioxydants semblent jouer un rôle important chez les bdelloïdes, nous avons alors pensé que la survie de ces organismes pourrait être liée à l'accumulation des dommages oxydatifs avec le temps passé en dessiccation et nous avons étudié l'évolution de ces dommages lors de l'entrée en dessiccation ainsi qu'au cours de la dessiccation mais aussi au cours d'une cinétique de réparation.

Comme les résultats de Krisko *et al.*⁵⁶ montrent qu'une faible dose de radiations induit une augmentation du taux de carbonylation protéique, et comme le phénomène de dessiccation s'apparente à la radiation, l'entrée en dessiccation pourrait induire, *via* la production de ROS, une accumulation des dommages oxydatifs dans les échantillons de notre expérience OxiELISA. Cependant, si les dommages induits par la dessiccation équivalent à une dose de radiations inférieure à 400 Gy (phase de lag chez les bdelloïdes), alors l'accumulation de dommages oxydatifs pourrait n'être que très légère et donc non détectable par notre expérience. Nos résultats OxiELISA ne nous permettent pas de répondre à cette question étant donné que nous observons une augmentation ou une diminution des dommages oxydatifs lors de l'entrée en dessiccation selon l'expérience OxiELISA réalisée. Les résultats de l'expérience OxyBlot, réalisée une seule fois avec les mêmes échantillons que la première expérience OxiELISA, montrent également une augmentation de la carbonylation protéique lors de l'entrée en dessiccation (**Fig. 22**, puits 2).

Nos résultats semblent suggérer qu'il n'y a pas d'accumulation des dommages oxydatifs avec le temps passé en dessiccation. Cependant, nous ne pouvons pas tirer de conclusions de nos résultats car l'expérience OxiELISA n'est pas reproductible (augmentation/diminution des dommages oxydatifs) et l'OxyBlot n'a été réalisé qu'une seule fois. En effet, nous n'avons pas obtenu suffisamment de protéines d'individus *A. vaga* lors de l'extraction protéique pour réaliser à nouveau l'Oxyblot.

Une autre observation qui nous permet de dire que l'expérience OxiELISA n'est pas reproductible est l'obtention de valeurs de carbonylation différentes. En effet, au cours des trois expériences OxiELISA réalisées, nous avons vu le range de valeurs obtenues tripler/quadrupler

pour les deux dernières expériences (**Fig. 20 et 21**). Nous avons vu dans les résultats que cette différence n'était pas due à la méthode d'incubation de la plaque ELISA et nous pensons donc que les échantillons auraient pu subir des dommages oxydatifs supplémentaires durant leur traitement. Une dernière hypothèse est que le kit OxiELISA utilisé (nous n'avons pas pu utiliser le kit testé par Radman car il n'est plus produit pour cause de reproductibilité) n'est pas assez optimisé ou fiable puisque l'expérience n'est pas reproductible.

D'autre part, nous avons réfléchi à une première hypothèse qui pourrait expliquer la raison pour laquelle nous n'observons pas d'accumulation des dommages oxydatifs avec le temps passé en dessiccation (en considérant que c'est réellement ce qu'il se passe). Cette hypothèse est la suivante : les ROS pourraient être produits durant la phase de transition entre l'état « hydraté » et « desséché ». Étant donné que le métabolisme des bdelloïdes est à l'arrêt durant la dessiccation^{2,4}, il pourrait ne pas y avoir de production supplémentaire de ROS au cours de la dessiccation. Cependant, les ROS sont connus pour réaliser des réactions d'oxydation en chaîne⁵⁵ qui ne requièrent pas d'activité métabolique. Or, nous avons vu dans l'introduction que lors de la dessiccation, le cytoplasme cellulaire adopte un état vitreux qui emprisonne les molécules^{61,62} et empêche donc probablement les molécules oxydées instables de réagir avec d'autres molécules et de les oxyder. Une seconde hypothèse que nous émettons suggère que des molécules protectrices (antioxydantes) empêchent l'accumulation de dommages oxydatifs lorsque les bdelloïdes sont desséchés. Cependant, les travaux de Krisko *et al.*⁵⁶ montrent que les molécules antioxydantes ont un effet tampon protecteur et donc ralentissent l'accumulation des dommages oxydatifs mais ne l'annulent pas (besoin d'une dose de radiations plus importante pour atteindre le même taux de carbonylation que chez *C. elegans*). Il serait important de doser les ROS au cours d'une cinétique de dessiccation afin de pouvoir répondre à cette question.

Enfin, nous ne pouvons tirer aucune conclusion quant à la question de la réparation des dommages oxydatifs étant donné que l'expérience OxiELISA n'est pas reproductible et donc pas fiable.

4.2. Étude de l'intégrité génomique d'*A. vaga* lors de la dessiccation et de l'irradiation par protons

4.2.1. Visualisation de la réparation de l'ADN

Les expériences de Hespeels *et al.*⁸ nous ont précédemment montré que des bdelloïdes dont le génome a été clivé en morceaux *via* des DSBs induites lors de la dessiccation sont capables de réparer leur ADN au cours d'une cinétique de réhydratation (0H – 48H). Ces résultats ont cependant montré que des fragments d'ADN créés par des DSBs étaient toujours présents après 48H de réhydratation, bien qu'une partie de l'ADN ait été réparée. Nous avons donc voulu voir si une réhydratation plus longue permettait aux bdelloïdes de réparer l'entièreté de leur génome ou si des fragments d'ADN persistaient. Par ailleurs, il a été observé au laboratoire que des individus *A. vaga* dont le génome contenait des DSBs étaient capables de récupérer un phénotype actif plus ou moins rapidement selon le temps passé en dessiccation. De plus, ces mêmes individus étaient également capables de pondre des œufs viables tout en ayant leur génome fragmenté. Les expériences que nous avons réalisées ont donc consisté à étudier et à comparer l'intégrité génomique des individus *A. vaga* (desséchés 14J) jusqu'à 7 jours de réhydratation avec celle observée chez les individus hydratés.

Nous observons tout d'abord, comme dans les résultats de Hespeels *et al.* (2014), que nos individus desséchés 14J et réhydratés 48H ont réparé partiellement leur ADN (**Fig. 23**). Si nous regardons maintenant nos résultats pour les individus desséchés 14J et réhydratés 7J, nous

n'observons presque pas d'amélioration de l'intégrité génomique (**Fig. 23**, puits 8) par rapport aux individus réhydratés 48H. Le mécanisme de réparation de l'ADN n'aurait donc plus lieu après 7J de réhydratation ou alors ce résultat suggère que de nouveaux fragments d'ADN ont été synthétisés et que les fragments endommagés restent ⁷⁶.

Les expériences de Gladyshev³⁸ ont montré que, comme *D. radiodurans*¹⁰, les bdelloïdes sont capables de résister à des doses extrêmes de radiations. En effet, Gladyshev montre que des bdelloïdes hydratés et irradiés (radiations gamma) à 700 Gy sont capables de réassembler partiellement leur génome fragmenté ³⁸. Afin de vérifier que l'ADN est bien réparé et afin de comparer la manière dont les bdelloïdes *A. vaga* gèrent des dommages plus ou moins agressifs, nous avons réalisé une expérience similaire à celle de Gladyshev et avons irradié des individus desséchés 1J avec des doses croissantes de radiations (100Gy et 500Gy). Ces expériences nous ont également donné, par comparaison, une idée de la quantité de dommages générés lors de la dessiccation. Tout d'abord, les résultats des individus irradiés à 500Gy nous permettent de confirmer que leur ADN est bien réparé et non dégradé tel que démontré par Gladyshev ³⁸. En effet, à 500Gy d'irradiations et 0H de réhydratation, le génome des individus ne semble plus contenir de gros fragments d'ADN (>2200 Kb) puisqu'on ne voit plus de tâche noire à ce niveau. Par ailleurs, les fragments d'ADN générés mesurent en moyenne 365 Kb. En sachant que les radiations génèrent environ 0,005 DSB/Mb/Gy⁷ et en sachant que le génome d'*A. vaga* mesure en moyenne 244 Mb⁴⁸ et contient 12 chromosomes (20,33 Mb/chromosome), nous pouvons calculer la taille moyenne théorique des fragments générés par une irradiation de 500Gy : $0,005 \text{ DSB} \times 500\text{Gy} \times 20,33 \text{ Mb} = 50,825 \text{ DSBs/chromosome}$ et donc $20,33 \text{ Mb} / 50,825 \text{ DSBs} = 0,4 \text{ Mb} = 400 \text{ Kb}$. Les fragments d'ADN générés au cours d'une irradiation de 500 Gy mesurent donc en moyenne 400 Kb, ce que nous retrouvons bien sur notre gel et ce qui explique que nous ne voyons presque plus de gros fragments d'ADN chez ces individus (**Fig. 25**, puits 3). Néanmoins, lors de la réhydratation, nous voyons réapparaître des fragments d'ADN de grande taille (>2200 Kb) qui ne peuvent provenir que du réassemblage des fragments d'ADN d'environ 400 Kb (**Fig. 25**, puits 4-8), ce qui prouve que l'ADN est en grande partie réparé lors de la réhydratation (et non dégradé). Enfin, après 7J de réhydratation des individus irradiés à 500 Gy, nous observons toujours la présence de gros fragments d'ADN (>2200 Kb) qui proviennent du réassemblage des petits fragments d'ADN (400 Kb) entre eux.

Si nous comparons les résultats des individus desséchés et des irradiés, nous pouvons dire qu'une dessiccation de 14J induit moins de dommages qu'une irradiation de 100 Gy, en observant l'allure et l'intensité des smear (225-1600 Kb) et des tâches sombres (>2200 Kb). Une irradiation à 100 Gy induit des fragments de taille supérieure à 2000 Kb en moyenne, ce qui explique la présence de la tâche noire intense au niveau de 2200 Kb (**Fig. 24**, puits 3). Cette tâche contient donc les fragments d'ADN d'environ 2200 Kb générés par les radiations et ne pouvant pas être résolus puisque notre programme PFGE nous donne une résolution des fragments situés entre 225 et 1600 Kb. Comme nous pensons qu'une dessiccation de 14 jours induit moins de dommages qu'une irradiation à 100 Gy, nous spéculons qu'une dessiccation de 14 jours induit la fragmentation du génome en portions d'ADN supérieur à 2000 Kb.

Nous avons vu que 7 jours de réhydratation ne suffisaient pas à permettre la réparation de tous les dommages à l'ADN (**Fig. 23-25**, puits 8). Nous pensons que soit les individus *A. vaga* posséderont toujours des cassures d'ADN résiduelles après une dessiccation, ces dernières n'empêchant pas les bdelloïdes de retrouver leur phénotype actif et de se reproduire normalement, soit ils réparent des parties *de novo* et des fragments d'ADN restent donc après la réparation du génome.

Les bdelloïdes étant des organismes eutéliques (nombre de cellules fixé lors de l'éclosion⁷⁷), il se pourrait qu'ils réparent prioritairement l'ADN des cellules germinales, si celui-ci est touché

par les DSBs, afin de pouvoir développer des œufs viables rapidement. Ils consacraient donc moins d'importance à réparer l'ADN des cellules somatiques puisque celles-ci sont toutes présentes dès l'éclosion de l'individu et ne se diviseront donc plus. Il se pourrait également que les cellules germinales soient protégées contre les dommages à l'ADN induits par la dessiccation/radiation et la réparation que nous observons se réaliserait donc uniquement dans les cellules somatiques. Cela expliquerait pourquoi les bdelloïdes soient capables de pondre rapidement après une dessiccation/radiation. Cependant, des expériences de Gladyshev ont montré que l'ADN des cellules germinales était également touché par les DSBs induites par les radiations gamma et était également soumis à un mécanisme de réparation³⁸. De plus, les radiations par protons réalisées par Hespeels *et al.*⁸ ciblent directement l'ADN (sans former des ROS), contrairement aux radiations gamma et à la dessiccation qui induisent la formation de ROS allant eux-mêmes cibler l'ADN et induire les DSBs. Les radiations par protons sont donc censées cibler l'ADN sans distinguer s'il est contenu dans des cellules somatiques ou germinales. Mais alors, la réparation est-elle privilégiée dans les cellules germinales par rapport aux cellules somatiques ? Nous avons tenté de répondre à cette question en réalisant les expériences TUNEL.

4.2.2. Visualisation du réassemblage génomique au cours de la réparation de l'ADN

Lors de ce mémoire, nous avons cherché à comprendre comment le génome d'*A. vaga* est réparé après la réhydratation. Les rotifères bdelloïdes étant asexués, des mécanismes doivent avoir été mis en place pour leur permettre d'évoluer. La dessiccation et les DSBs induites par celle-ci pourraient favoriser, par exemple, les transferts horizontaux de gènes^{38,48,50}. La structure du génome, incompatible avec le processus de méiose, suggère de profonds événements de restructuration chromosomiques. Il est important d'évaluer la potentielle existence de telles modifications. La question est : dans un système fermé (présence de bdelloïdes uniquement), les bdelloïdes desséchés/irradiés vont-ils réarranger leur génome selon le modèle de départ observé en condition d'hydratation, ou peuvent-ils tolérer un réassemblage « aléatoire » (insertions/délétions/translocations) ?

Au cours de ce mémoire, nous avons voulu adapter la méthode PFGE pour étudier l'architecture du génome et son éventuel réassemblage après réhydratation. En effet, l'enzyme NotI donne un profil de restriction exploitable, avec des tailles de fragments situés entre 365 et 1600 Kb. Nous avons réalisé des tests visant à vérifier que ces bandes n'étaient pas dues au tampon ou à des traitements mais bien à l'ajout de l'enzyme. Le but de ces expériences était ensuite d'observer une disparition du profil de restriction lors de la dessiccation ou de l'irradiation des individus (0H réhydratés) et ensuite d'observer une réapparition des bandes de ce profil au cours de la réhydratation. Dans le cas où le génome est réarrangé de la même manière que le génome de départ, nous devrions voir réapparaître un profil de restriction identique à celui observé chez les individus hydratés. Dans le cas où des réarrangements ont lieu, certaines bandes pourraient voir leur taille varier, faisant ainsi apparaître ou disparaître certaines bandes du profil de restriction.

Un premier problème technique qui apparaît est la digestion incomplète de notre génome. Nous observons un profil de restriction avec l'enzyme NotI mais une partie des fragments se trouvent toujours à >2000 kb. Néanmoins, nous émettons quelques conclusions préliminaires. Les premières expériences réalisées sur des individus desséchés 14J (**Fig. 26**) et des individus desséchés 1J et irradiés à 100 Gy (**Fig. 27**), n'ont pas permis d'observer une altération du profil de restriction chez les individus desséchés/irradiés et non réhydratés (**Fig. 26 et 27**, puits 3). Les dommages induits par une dessiccation de 14J et une irradiation de 100 Gy ne sont pas suffisants (génération de fragments de 2000 Kb environ) pour altérer les fragments d'ADN

généralisés par NotI. Cela est valable pour les fragments d'ADN de taille comprise entre 225 et 1600 Kb. Nous ne savons pas comment la dessiccation affecte les fragments d'ADN de taille supérieure à 2200 Kb puisque ces fragments ne sont pas résolus. Nous savons cependant que ces derniers ont été créés *via* des DSBs car nous observons la présence d'un gros spot noir (nombreux fragments de cette taille : >2200 Kb, **Fig. 26 et 27**) et il serait intéressant d'optimiser la PFGE afin de rendre ces fragments « résolus ». L'absence de disparition du profil de restriction suite à une dessiccation de 14 jours et à une irradiation de 100 Gy pourrait s'expliquer par le fait que les cassures d'ADN ont lieu dans des régions différentes du génome. En effet, les bdelloïdes étant tétraploïdes dégénérés, ils peuvent posséder une même région en 4 copies plus ou moins identiques (selon le degré de divergence et de colinéarité)⁴⁸. La probabilité qu'une DSB ait lieu au niveau d'un site de restriction NotI semble faible dans le cas d'une dessiccation de 14 jours ou d'une irradiation à 100 Gy (approx. 122 DSBs/génome).

Nos résultats nous ont montré qu'une irradiation de 250 Gy (génération de fragments de 800 Kb en moyenne, 305 DSBs/génome, **Fig. 29**, puits 4) suffisait à modifier le profil de restriction NotI (**Fig. 29**, puits 1). Les DSBs induites par les radiations auraient donc clivé l'ADN entre les sites de restriction enzymatique de manière suffisante à modifier le profil de restriction observé (les bandes changent de taille : très variable car les DSBs coupent au hasard, ce qui fait apparaître un smear). Il semble cependant préférable d'irradier les individus *A. vaga* à 500 Gy (fragments de 400 Kb en moyenne, 610 DSBs/génome) afin d'être certain d'avoir suffisamment détruit le profil de restriction (**Fig. 29**, puits 5). Nous voulions savoir si la dessiccation est capable d'induire suffisamment de dommages pour altérer le profil de restriction. Nos résultats montrent qu'une dessiccation de 42J (**Fig. 29**, puits 8) s'apparente à une irradiation de 100 Gy (**Fig. 29**, puits 3) et ne suffit pas à détruire le profil de restriction. Il semblerait cependant qu'une dessiccation de 85J induise suffisamment de dommages de manière à altérer notre profil de restriction, cette dernière s'apparentant à une irradiation de dose comprise entre 100 Gy et 250 Gy. Il est important de noter ici que ces expériences sont réalisées en conditions de laboratoire et donc en conditions contrôlées. Dans la nature, les bdelloïdes desséchés sont également soumis aux UVs ainsi qu'aux variations de température et d'humidité. Les expériences de Hespeels *et al.*⁸ ont montré que l'exposition d'individus *A. vaga* desséchés 1J à des UVA et des UVB induisait également des DSBs et donc la dégradation de l'ADN. Au vu de cela, il est probable que la dessiccation (avec tout ce qu'elle implique : UVA, UVB...) en conditions « naturelles » soit plus agressive qu'une irradiation à 250 Gy.

Enfin, concernant la question du réarrangement génomique au cours de la réhydratation/réparation de l'ADN, les résultats de ces expériences nous ont montré (1) qu'un profil de restriction réapparaît (de manière faible) dès 8H de réhydratation des individus (**Fig. 28**, puits 4) et (2) que ce profil est exactement le même (en termes de tailles de bandes) que celui observé chez les individus hydratés (**Fig. 28**, puits 1). Il semblerait donc que les individus *A. vaga* réarrangent leur génome selon le modèle de départ (condition hydratée) mais à nouveau, nous ne pouvons pas conclure cela vu la digestion incomplète obtenue.

La structure du profil génomique n'a pas seulement été étudiée chez des individus irradiés et réhydratés mais également chez la descendance de ces individus. Nous avons voulu voir s'il est possible que l'ADN des cellules germinales d'individus irradiés soit réparé de manière différente que l'ADN des cellules somatiques. Nos résultats ont montré que l'ADN de la génération F1 d'individus irradiés à 500 Gy et réhydratés 40J semble contenir le même profil de restriction que leurs mères (**Fig. 30** puits 5 et 6). De plus, nous avons voulu comparer la structure génomique chez des individus (sœurs) de la génération Fx d'individus a irradiés à 500 Gy ainsi que chez des individus (cousines) des générations Fx, Fy et Fz d'individus a, b et c irradiés à 500 Gy. Nos résultats ont montré que la structure génomique chez des individus

sœurs (provenant de l'œuf 5 et de l'œuf 9 de la mère 16) était identique (**Fig. 30**, puits 7 et 8). De la même manière, la structure génomique d'individus cousines (provenant de l'œuf 9 de la mère 16, de l'œuf 3 de la mère 35 et de l'œuf 5 de la mère 56) est également identique (**Fig. 30**, puits 8, 9 et 10). Nous pouvons suggérer que (1) l'ADN germinale est réparé de la même manière que l'ADN somatique puisque la génération F1 contient le même profil génomique que la génération mère ; (2) le profil génomique est transmis tel quel à travers les générations puisque des individus de la F5 et des individus de la F9 possèdent la même structure génomique. Néanmoins ce sont des résultats préliminaires qui requièrent encore des optimisations et vérifications avant de pouvoir émettre une conclusion.

Cette technique d'étude de la restructuration génomique devrait être (1) validée par l'utilisation d'autres enzymes de restriction qui nous permettraient d'étudier le phénomène de restructuration à d'autres endroits du génome (autres fragments). Ces enzymes nous permettraient donc de valider ou de réfuter nos résultats. (2) validée par d'autres techniques d'analyse plus fine du génome (voir perspectives).

4.3. Visualisation des cassures d'ADN chez des bdelloïdes *A. vaga* au cours de la dessiccation et de la réhydratation

Nos résultats PFGE montraient que l'ADN des bdelloïdes n'était pas totalement réparé après 7J de réhydratation. Cependant, lors de la réhydratation de nos individus *A. vaga*, nous avons observé que ces derniers étaient capables de pondre des œufs viables après environ 48H de réhydratation, alors que leur ADN contenait encore de nombreuses DSBs. Nous nous sommes donc demandé si les cellules germinales des individus *A. vaga* sont touchées de la même manière que les cellules somatiques par les DSBs et, si oui, la réparation de l'ADN est-elle favorisée dans les cellules germinales par rapport aux cellules somatiques ? En effet, les mécanismes de réparation de l'ADN sont peut-être ciblés vers l'ADN des cellules germinales étant donné que celles-ci doivent subir deux divisions de maturation afin de développer un embryon⁷⁷. Les cellules somatiques, quant à elles, ne se diviseront plus et pourraient donc supporter la présence de DSBs sans que celle-ci ait un impact négatif sur la cellule⁷⁷. Afin de répondre à ces questions, nous avons adapté la technique du TUNEL dans le but de localiser les cassures d'ADN dans les différentes cellules des bdelloïdes *A. vaga* puisque nous pouvons distinguer les cellules somatiques des cellules germinales à l'aide du DAPI.

Après plusieurs expériences d'optimisation du TUNEL, nous pouvions affirmer que cette technique semblait applicable aux bdelloïdes *A. vaga*. Cependant, les résultats que nous avons obtenus étaient différents selon le type de support sur lequel les individus étaient attachés. En effet, au cours de ces expériences, nous avons décidé de remplacer les lames SuperFrost par des coverslips, dans le but d'obtenir un marquage plus homogène des individus (et également dans le but de réduire le coût financier des réactifs). Alors que nos contrôles positifs ainsi que nos tests TUNEL fonctionnaient correctement sur lames (**Fig. 31 et 32**), nos résultats ont montré tout le contraire sur les coverslips (**Fig. 33, 36-38**).

De manière générale, les expériences réalisées sur lames ont montré que (1) la technique est applicable aux individus *A. vaga* puisque nous avons observé les résultats que nous attendions dans les contrôles positif et négatif chez les individus hydratés ; (2) le DAPI nous permet de distinguer les cellules somatiques des cellules germinales ; (3) 42 jours de dessiccation induit des cassures d'ADN chez les individus *A. vaga*. Notre expérience TUNEL a donc permis de valider les résultats obtenus avec l'expérience PFGE dans laquelle on observait une fragmentation de l'ADN lors de la dessiccation⁸.

Lorsque nous avons remplacé les lames par les coverslips, nous avons dû trouver une autre méthode de perméabilisation membranaire. En effet, l'utilisation de coverslips implique de travailler avec des volumes de réactifs plus petits. Ainsi, lors de la perméabilisation au micro-ondes, tout le liquide (tampon citrate) s'évaporerait et nous avons peur que ce traitement soit trop agressif pour nos individus. Nous avons donc perméabilisé les membranes avec du PBS-Triton X-100 1% mais ce dernier ne semble pas être un traitement adéquat puisque nous avons rencontré des problèmes de perméabilisation à chaque expérience impliquant le PBS-Triton. En effet, nous avons observé des marquages verts (**Fig. 36a, 37a, 37h, 38f**) dans le corps de nos bdelloïdes, mais ceux-ci ne semblaient pas colocalisés avec le marquage DAPI et ont donc été considérés comme du bruit de fond. De plus, les tests TUNEL sur les individus desséchés 7J, 14J et 21J ne nous ont montré aucune présence de DSB, ce qui est assez étonnant puisque les expériences PFGE nous ont montré qu'une dessiccation de 14J induisait des DSBs. Il serait donc intéressant de trouver une méthode de perméabilisation plus agressive que le PBS-Triton ou bien de recommencer ces expériences sur les lames qui nous donnaient de bons résultats tout en trouvant une façon d'homogénéiser le tout.

La réalisation de la cinétique de réparation croissante nécessitait de conserver les échantillons jusqu'à la réaction TUNEL finale afin de traiter tous les échantillons en même temps. Nos résultats ont montré que (1) la conservation dans l'éthanol induit des cassures d'ADN et ne sera donc plus utilisée, et (2) la conservation dans du PBS à 4°C semble meilleure que dans l'éthanol mais n'est toujours pas la méthode de conservation idéale puisque nous avons observé quelques cassures d'ADN dans les premières expériences. Suite à ces tentatives d'optimisation, nous avons décidé de réaliser la cinétique de réparation inverse afin d'éviter la conservation des échantillons. Cependant, le problème de perméabilisation observé précédemment (**Fig. 37a et 37h**) ne nous a pas permis d'étudier la réparation de l'ADN dans les cellules somatiques et germinales des individus *A. vaga*. Il est donc nécessaire de continuer à optimiser la technique du TUNEL sur nos bdelloïdes afin de trouver la méthode idéale qui nous permettrait d'obtenir les réponses à nos questions : les cellules germinales des individus *A. vaga* sont-elles touchées de la même manière que les cellules somatiques par les DSBs et, si oui, la réparation de l'ADN est-elle favorisée dans les cellules germinales par rapport aux cellules somatiques ?

4.4. Étude du cycle de vie des bdelloïdes *A. vaga* et des impacts de la dessiccation sur le fitness des individus

4.4.1. Cycle de vie des bdelloïdes *A. vaga* en conditions de laboratoire

Cette expérience avait pour but d'étudier le cycle de vie de nos bdelloïdes *A. vaga* en conditions de laboratoire (UNamur). Il est important de noter que le cycle de vie de nos individus varie selon les conditions dans lesquelles ils évoluent (nourriture, contaminations, température...), ainsi qu'en fonction de leur fitness de départ (le fitness de la mère peut avoir un impact sur le fitness de ses filles⁷⁵). Ceci explique pourquoi nous avons obtenus des courbes de fécondité et de survie sensiblement différentes lors de nos trois expériences « cycle de vie ».

Pour commencer, nous pouvons comparer nos résultats avec ceux de Ricci (1983⁷⁴). Premièrement, la courbe de fécondité de nos cycles de vie (**Fig. 39, 41 et 43**) ainsi que de celui de Ricci (**Fig. 16**) montre une augmentation de la fécondité qui atteint un pic pour ensuite diminuer et progressivement s'annuler. Cependant, les individus de Ricci pondent jusqu'à leur mort alors que les nôtres vivent encore un moment (environ 15 jours) après avoir fini de pondre. Ensuite, la courbe de survie de nos expériences dépend de la contamination bactérienne présente ou non dans nos boîtes multipuits. En effet, les deux premiers cycles de vie (**Fig. 39 et 41**), qui

étaient contaminés par des bactéries, montrent une chute de la courbe de survie au moment du pic de fécondité. Les individus doivent allouer une grande quantité d'énergie au moment du pic de reproduction ⁷⁴. Nous pensons que les bactéries présentes dans les puits contenant nos individus ont pu affaiblir ces derniers, qui auraient donc donné toute leur énergie résiduelle au moment du pic reproducteur et seraient morts à ce moment-là. Le troisième cycle de vie (**Fig. 43**), dont les boîtes multipuits étaient très propres et sans contamination, ne montre qu'une très légère diminution de la survie, même lorsque les individus commencent à ne plus se reproduire. Dans le cycle de vie de Ricci (**Fig. 16**), la chute de la survie est observée juste après le pic reproducteur et avant que les individus ne commencent à arrêter de pondre, ce qui n'est pas similaire à nos résultats. De plus, selon Ricci, l'espérance de vie moyenne des individus *A. vaga* en conditions de laboratoire est de 17 jours, alors que nous avons observé une espérance de vie moyenne d'environ 30 jours (max observé = 40 jours), en conditions de non contamination. Enfin, nous avons observé, comme Ricci, une éclosion des œufs environ 2 jours après la ponte, et, contrairement à Ricci, nous avons observé une morphologie de sénescence (grand corps de couleur sombre et granuleux) de nos individus *A. vaga*.

Plusieurs paramètres pourraient expliquer les différences observées entre nos individus et ceux de Ricci ⁷⁴: (1) Ricci utilise de l'eau dé-ionisée pour entretenir les cultures de populations clonales alors que nous utilisons de l'eau SPA ; (2) Ricci nourrit ses individus avec des bactéries *E. coli*, certaines levures et des particules de matière organique alors que nous nourrissons nos individus avec du jus de salade ; (3) Ricci a réalisé ses expériences sur des cohortes de 30 individus non isolés alors que nous avons réalisé nos expériences sur des individus (n=36, n=47 et n=38) isolés chacun dans un puits d'une plaque 12 puits. Peut-être que les individus ont un fitness différent selon qu'ils sont seuls dans le milieu, ou entourés par d'autres individus.

Une question principale nous est apparue à la suite de ces expériences : pourquoi nos individus *A. vaga* vivent-ils encore un long moment (approx. 15 jours) alors qu'ils ne pondent plus d'œufs ? Chez les métazoaires, les animaux restent en vie après s'être reproduits afin de prendre soin de leur progéniture ⁷⁸. Cependant, cela ne semble pas être le cas chez les bdelloïdes. Nous nous demandons donc pourquoi ils vivent si longtemps sans pondre aucun œuf. Les bdelloïdes sont des organismes eutéliques qui possèdent un nombre de cellules somatiques et germinales fixé dès la formation de l'embryon ⁷⁷. Nous avons vu dans l'introduction que des bdelloïdes de 7 jours (7 jours d'hydratation après l'éclosion) desséchés et réhydratés voyaient leur fitness augmenté et pondaient ainsi plus d'œufs que des individus hydratés en continu ⁷⁵. De plus, nous avons observé au laboratoire que la plupart des individus réhydratés après une dessiccation et isolés se remettaient à pondre. Ces observations pourraient être dues à plusieurs choses :

- (1) Les oocytes (nombre fixé) ne sont pas tous pondus avant la dessiccation et celle-ci permettrait donc d'enclencher la ponte des derniers œufs.
- (2) La dessiccation entraîne une eutélie réversible du germarium ⁷².

Nous savons aussi qu'une des causes du vieillissement est l'accumulation de dommages oxydatifs avec le temps. De ce fait, nous émettons l'hypothèse selon laquelle des bdelloïdes sénescents répareraient leurs dommages oxydatifs après dessiccation et en même temps répareraient leurs dommages oxydatifs accumulés lors du vieillissement. Cela permettrait un phénomène de « rajeunissement » des individus, dont les cellules contiendraient moins de dommages et seraient donc aptes à relancer le mécanisme de ponte qui aurait été altéré par les dommages oxydatifs engendré par leur vieillissement.

4.4.2. Dessiccation sur 1 individu (cycle de vie)

Cette expérience a été réalisée dans le but de répondre à la question « les bdelloïdes sénescents pondent-ils à nouveau après une dessiccation ? ». Après avoir mis au point le protocole de dessiccation sur 1 individu *A. vaga*, nous avons réalisé deux cycles de vie et donc deux dessiccations subséquentes aux cycles de vie. Comme nous avons pu le voir dans la partie « résultats », ces deux expériences identiques ont donné des résultats fort différents en termes de survie (réveil) des individus après la dessiccation. Cela s'explique probablement par le fait que le cycle de vie de la première expérience (deuxième cycle de vie) était contaminé par les bactéries. Ces dernières auraient donc diminué le fitness des individus *A. vaga*, entraînant une mort plus rapide et une diminution de la capacité à survivre à la dessiccation.

Certains individus de la seconde expérience (troisième cycle de vie) ont pondu des œufs après leur réveil suite à la dessiccation. Nous avons également vu que ces individus n'avaient peut-être pas arrêté de pondre, et n'étaient donc pas sénescents, avant d'être mis en dessiccation. Les individus dont nous étions sûrs qu'ils ne pondaient plus (sénescents) avant la dessiccation n'ont pondu aucun œuf après leur réveil. Cela signifie soit que la dessiccation n'entraîne pas la réparation de tous les dommages oxydatifs, soit que tous les ovocytes présents au départ ont été pondus et que la dessiccation ne permet pas une eutélie réversible du germarium soit que la dessiccation n'a aucun lien avec cette sénescence.

Une autre hypothèse, qui semble fort probable également, est que la dessiccation à laquelle ont été soumis nos individus *A. vaga* n'a pas induit assez de dommages oxydatifs. Les bdelloïdes possédant un arsenal d'antioxydants ⁴⁸, ils pourraient s'être contentés de ces derniers pour combattre les dommages oxydatifs induits par une dessiccation de 1J ⁵⁶. Les mécanismes de réparation des dommages oxydatifs n'auraient donc pas été nécessaires à ce niveau-là et n'auraient donc pas pu réparer les dommages oxydatifs engendrés lors du vieillissement. Une dessiccation plus longue devrait être testée.

Par ailleurs, nous avons observé après la dessiccation que les individus isolés avaient adopté un repliement différent de celui observé lorsque l'on observe des individus adultes desséchés au microscope. Nous pensons que les individus sénescents, ou en tout cas âgés, ont du mal à se replier correctement, peut-être à cause de leur morphologie de sénescence qui les en empêche, ou car ils ont plus de mal à se replier physiquement. Les observations de Marotta *et al.*²⁵ ont montré que lors de la mise en dessiccation, les bdelloïdes se replient sur eux-mêmes de telle façon à ce que leurs organes soient compactés entre eux. La manière dont les organes sont compactés est importante puisqu'elle doit permettre de protéger suffisamment les différentes structures corporelles contre les agressions extérieures, mais elle doit aussi permettre un dépliement rapide afin que les bdelloïdes récupèrent rapidement leur phénotype actif ²⁵. Lors des observations réalisées au laboratoire sur des individus jeunes et sénescents, nous avons observé que la morphologie après dessiccation était différente selon l'âge des individus. Les individus sénescents perdraient donc leur capacité à se replier correctement. Cela pourrait être dû à plusieurs choses : (1) les individus plus vieux sont aussi plus faibles : nous avons en effet observé au laboratoire que les individus sénescents sont moins réactifs (se déplacent plus lentement, prennent du temps à se mettre en tun) ; (2) les individus sénescents sont plus grands et possèdent donc des structures corporelles plus grandes également, ce qui pourrait perturber le repliement correct lors de la dessiccation ; (3) les individus sénescents possèdent plus de dommages oxydatifs et ceux-ci pourraient altérer le repliement correct lors de la dessiccation. De ce fait, le dépliement des individus sénescents après la dessiccation pourrait se réaliser de telle sorte que les structures corporelles ne seraient plus disposées de manière fonctionnelle, altérant ainsi le mécanisme de ponte et empêchant la sortie des œufs. Tout ceci reste à ce stade spéculatif.

Enfin, ces expériences nous permettent d'affirmer que le tréhalose extracellulaire joue un rôle protecteur lors de la dessiccation puisqu'il permet d'augmenter considérablement la survie des individus isolés et âgés (**Fig. 38**), en tout cas si ces individus ont évolué dans des conditions de non-contamination. Le tréhalose pourrait donc jouer un rôle protecteur en restant à l'état « extracellulaire » et ainsi protéger les membranes externes des bdelloïdes contre les agressions extérieures lors de la dessiccation. Le tréhalose pourrait aussi traverser les membranes cellulaires et pénétrer dans les cellules des individus *A. vaga*, jouant un rôle au niveau des membranes mais aussi des protéines et des autres macromolécules pouvant être oxydées ou altérées lors de la dessiccation. Étant donné que la dessiccation induit également des dommages à l'ADN, nous pensons que le tréhalose pourrait jouer un rôle protecteur à ce niveau également, en réduisant le nombre de DSBs induites lors de la dessiccation.

4.5. Visualisation d'un éventuel effet protecteur du tréhalose au niveau de l'intégrité génomique des individus *A. vaga* au cours d'une dessiccation

Des expériences réalisées par Hespeels *et al.* (2015 ⁶⁸) nous ont montré que le génome des bdelloïdes contient des gènes codant pour l'enzyme tréhalose-6-phosphate synthase ainsi que des gènes codant pour l'enzyme tréhalase. Cependant, leur génome ne semble pas contenir d'enzyme tréhalose-6-phosphatase, et les bdelloïdes ne semblent pas produire de tréhalose en grande quantité tel que décrit chez d'autres métazoaires ⁶⁸. Le niveau élevé d'expression des gènes codant pour la tréhalase pourrait également expliquer que le tréhalose, même s'il est produit en faibles quantités, ne soit pas détecté car la tréhalase le dégraderait rapidement ⁶⁸. Il a également été montré que les gènes des bdelloïdes *A. vaga* impliqués dans le métabolisme du tréhalose proviennent de HGT à partir de plantes ⁶⁸. Comme nous l'avons vu dans l'introduction, le tréhalose est produit (intracellulaire) chez une grande partie des organismes anhydrobiotes en réponse à la dessiccation et protège les composants cellulaires contre la dénaturation et l'oxydation ^{62,63}. Dans le cadre de la recherche d'optimisation de la survie à la dessiccation des individus isolés (**cf. 3.4.2**), ces informations m'ont personnellement amenée à penser que l'ajout de tréhalose extracellulaire pourrait peut-être également avoir un effet protecteur au niveau des bdelloïdes et pourrait ainsi améliorer la survie des individus isolés. Les résultats des expériences que j'ai réalisées ont confirmé cette hypothèse puisque nous sommes arrivés à atteindre une survie de 100 % après l'ajout d'une solution de tréhalose 40% (**Fig. 38**).

Au vu de ces résultats enthousiasmants, nous avons voulu aller plus loin et avons pensé que le tréhalose pourrait également jouer un rôle protecteur au niveau de l'ADN des bdelloïdes. Les expériences PFGE que nous avons réalisées dans ce contexte (**Fig. 42**) ont montré une quantité de cassures d'ADN plus faible chez les individus desséchés en présence de tréhalose (**Fig. 42**, puits 8) que chez les individus desséchés en absence de ce dernier (**Fig. 42**, puits 7). Cela suggère donc, comme nous espérons le montrer, que le tréhalose a également un effet protecteur au niveau des DSBs induites lors de la dessiccation. Ces résultats sont en concordance avec ceux de Yoshinaga *et al.* (1997) obtenus lors d'une expérience démontrant l'effet protecteur du tréhalose au niveau de l'ADN en conditions de radiations β ou γ ⁶⁴. Ces chercheurs ont montré que l'effet protecteur était proportionnel à la concentration en tréhalose ajouté. Selon eux, le tréhalose permettrait de séquestrer les ROS présent à proximité du noyau et ainsi de les empêcher d'oxyder les macromolécules qu'ils rencontrent.

Suite à l'observation de ces nouveaux résultats, nous avons émis une hypothèse qui permettrait d'expliquer la raison pour laquelle les bdelloïdes ne produisent pas de tréhalose, ou en tout cas pas assez suffisamment que pour être détecté. Les multiples fragmentations de leur ADN lors des dessiccations et la réparation imparfaite de cet ADN pourrait être un mécanisme qui crée

de la diversité génétique au sein d'une lignée clonale ^{43,44}. Le fait de se cliver pourrait aussi permettre au génome d'intégrer des fragments d'ADN étranger et ainsi de se diversifier dans une population clonale d'individus bdelloïdes. Étant donné que le tréhalose semble réduire les dommages à l'ADN lors de la dessiccation (**Fig. 42**), ce sucre non-réducteur pourrait empêcher les bdelloïdes d'évoluer comme ils l'ont fait s'il avait été produit lors de la dessiccation, comme chez la plupart des autres anhydrobiotes.

Enfin, tout comme chez les plantes, il semblerait que le tréhalose soit produit en très faible quantité, comme l'ont démontré Hespeels *et al.* ⁶⁸ dans leurs expériences de qPCR. Chez les plantes, le tréhalose-6-phosphate et le tréhalose (produit en faible quantité) agissent comme molécules signal en réponse à un stress. « Il est donc nécessaire pour les plantes de produire beaucoup de tréhalases afin de dégrader les molécules signal et ainsi leur éviter d'interférer avec le métabolisme général des plantes » ⁶⁸. Le tréhalose-6-phosphate et le tréhalose éventuel des bdelloïdes pourraient donc également agir comme molécules signal en réponse à un stress, puisque le métabolisme du tréhalose des bdelloïdes a été acquis par HGT à partir de plantes et était donc identique au départ ⁶⁸.

5. Perspectives

5.1. Étude des dommages oxydatifs chez des bdelloïdes *A. vaga*

Malgré la difficulté d'obtenir des résultats satisfaisant sur l'évolution des dommages oxydatifs (type carbonylation des protéines), il nous semble indispensable de continuer à caractériser ces derniers et rechercher à améliorer notre compréhension des processus oxydatifs pouvant induire des dommages chez *A. vaga*. En effet, des expériences ont montré que la diminution de la survie à la dessiccation n'était pas liée à l'accumulation de DSBs au sein du génome des bdelloïdes. De plus, Radman⁵⁶ a montré que les bdelloïdes sont résistants aux radiations (/dessiccation) *via* un effet tampon protecteur qui limite l'accumulation de dommages oxydatifs au sein des organismes. Nous savons également que les bdelloïdes sont susceptibles de posséder un système antioxydant codé par un grand nombre de gènes⁴⁸. Comme la résistance aux dommages oxydatifs semble être un point clé dans la résistance à la dessiccation, il semble probable que l'accumulation de dommages oxydatifs soient liée à la diminution de la survie à la dessiccation chez les bdelloïdes. C'est ce que nous avons tenté de démontrer au cours de ce mémoire.

Le problème principal auquel nous avons été confrontés deux fois (mêmes échantillons) est l'observation de la diminution du taux de carbonylation chez les individus desséchés comparés aux individus hydratés. Il est cependant peu probable que la dessiccation entraîne une diminution des dommages oxydatifs. De plus, ces résultats (**Fig. 20 et 21**) ont été obtenus à partir des mêmes échantillons. L'explication la plus probable pour ces résultats donc est que les tubes « contrôle hydratés » et « contrôle desséchés » ont été échangés au début de l'expérience. Il serait alors approprié de recommencer l'entièreté de l'expérience OxiELISA, y compris la réalisation des échantillons protéiques depuis la collecte des individus *A. vaga* jusqu'à l'extraction et au dosage protéique (en prenant bien soin de ne pas intervertir les tubes).

Par ailleurs, les résultats de la première expérience OxiELISA ont été confirmés par la méthode Oxyblot (**Fig. 19 et 22**). La méthode Oxyblot pourrait donc être une alternative à la méthode OxiELISA puisqu'elle semble fournir les mêmes résultats. De plus, l'Oxyblot représente un coût financier moindre par rapport à l'OxiELISA. L'inconvénient est que l'Oxyblot demande plus de matériel pour être mis en œuvre et une alternative pourrait être de réaliser un Dotblot (Comm. Pers. J. Virgo).

Comme l'expérience OxiELISA n'est pas reproductible, nous avons besoin d'un contrôle positif afin de savoir si nous pouvons nous fier aux résultats de l'OxiELISA. Il est donc nécessaire de doser le stress oxydatif intracellulaire lors de la dessiccation et en parallèle, d'étudier l'évolution des dommages oxydatifs (carbonylation protéique) chez les individus *A. vaga*. Le dosage du stress oxydatif (ROS) pourrait se réaliser par l'ajout d'une sonde carboxy-H2DCFDA réduite (C-400, Molecular Probes) dans une solution d'individus *A. vaga* récoltés. Une fois à l'intérieur des cellules des bdelloïdes, des estérases vont couper les groupes acétates de la sonde, l'empêchant ainsi de sortir des cellules (on dose les ROS intracellulaires uniquement). En présence de ROS, la sonde réduite non fluorescente va être oxydée et va ainsi émettre de la fluorescence qui sera proportionnelle au nombre de sondes oxydées. La fluorescence

mesurée ici sera la fluorescence émise dans un nombre total d'individus inconnu. Afin de normaliser la fluorescence pour chaque condition testée, il sera nécessaire de réaliser un dosage protéique dont les valeurs de résultats seront proportionnelles à la quantité d'individus présents au départ. La valeur de fluorescence mesurée (Do) dans chaque échantillon sera donc divisée par la concentration protéique présente dans chaque échantillon. Le dosage des ROS requiert cependant un contrôle positif qu'il est difficile de réaliser. En effet, des expériences ont été réalisées avec de l' H_2O_2 en tant que contrôle positif mais ce dernier semble être instable et donner des résultats aléatoires (Comm. Person. J. Virgo).

Outre le fait d'étudier le parallélisme entre les dommages oxydatifs et les ROS induits lors de la dessiccation, il serait également intéressant d'étudier l'activité enzymatique des enzymes antioxydantes lors d'une cinétique de dessiccation. En effet, nous savons maintenant que les bdelloïdes possèdent de nombreuses copies de gènes codant pour des enzymes antioxydantes⁴⁸. Une étude chez le tardigrade *Paramacrobiotus richtersi*³¹ a montré que la superoxyde dismutase ainsi que la glutathione peroxydase voyaient leur activité (quantité de substrat transformée en produit par unité de temps) augmenter de manière significative chez des individus desséchés, comparé à des individus hydratés. De plus, selon les expériences de Radman, les enzymes antioxydantes constituent un des moyens par lequel les bdelloïdes résistent aux radiations ainsi qu'à la dessiccation⁵⁶. Il serait donc intéressant de voir comment l'activité des enzymes antioxydantes varie lors de l'entrée en dessiccation, lors de la dessiccation elle-même, ainsi que lors de la réhydratation chez les bdelloïdes. Les enzymes antioxydantes qui seraient intéressantes à étudier (*via* l'utilisation d'un *antioxidant activity assay kit*) sont par exemple (1) la superoxyde dismutase (SOD) : elle « convertit les radicaux libres superoxydes en H_2O_2 , réduit par la catalase »⁷⁹; (2) la glutathion-réductase (GR) couplée au taux de glutathion présent dans la cellule : « l'anion glutathion (GS^-) est oxydé en glutathion disulfide (GSSG) en présence de ROS, et le GSSG est ensuite réduit en glutathion (GSH) par la GR »⁷⁹; (3) la catalase et la glutathion peroxydase (GPx) : la catalase converti l' H_2O_2 en $H_2O + O_2$, alors que la GPx catalyse la réaction du GSH avec l' H_2O_2 pour former du GSSG + H_2O ⁷⁹; et (4) la thiorédoxine qui séquestre les ROS⁷⁹. Il serait également intéressant d'étudier l'expression des gènes codant pour ces différentes enzymes en réalisant une PCR quantitative en temps réel³⁴.

Enfin, les dommages oxydatifs ne concernent pas uniquement les protéines puisque les lipides et l'ADN peuvent aussi être oxydés⁸⁰. Il serait donc intéressant d'étudier les dommages oxydatifs à l'ADN (8-oxo-2'-deoxyguanosine) ainsi que la peroxydation des lipides. Les dommages oxydatifs à l'ADN pourraient être mis en évidence par immunofluorescence [Anti-8-oxo-dG (Clone 2E2), Trevigen]. Ainsi, un anticorps primaire anti-8-oxo-2'-deoxyguanosine irait reconnaître les dommages 8-oxo-dg à l'ADN et un anticorps secondaire couplé à un fluorochrome irait reconnaître l'anticorps primaire. Les individus *A. vaga* pourraient alors être observés en microscopie confocale à fluorescence. Il faudrait cependant trouver une méthode de fixation des individus *A. vaga* qui soit compatible avec les anticorps utilisés.

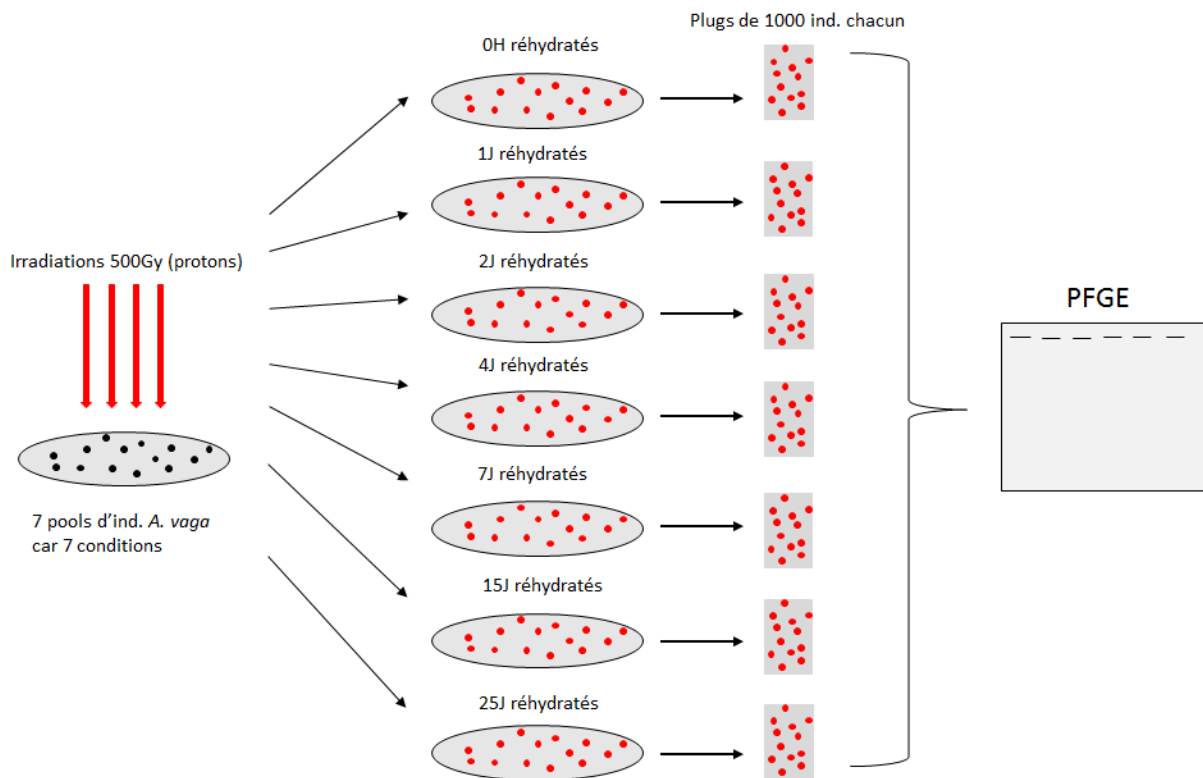


Figure 46 : Schéma expérimental de l'expérience visant à étudier la réparation de l'ADN chez les bdelloïdes *A. vaga*. Les bdelloïdes (7 pools différents) sont irradiés (à sec) à 500 Gy (protons) puis sont réhydratés durant 0H, 1J, 2J, 4J, 7J, 15J ou 25J. Il est important de ne pas aller au-delà de 30J de réhydratation car nous aurions alors une majorité d'individus de la F1. Les plugs de 1000 individus chacun sont ensuite réalisés pour chaque condition et sont déposés dans les puits d'un gel d'agarose afin de faire migrer l'ADN par PFGE. Les points noirs représentent les individus *A. vaga* desséchés 1J et les points rouges représentent les individus *A. vaga* irradiés à 500 Gy.

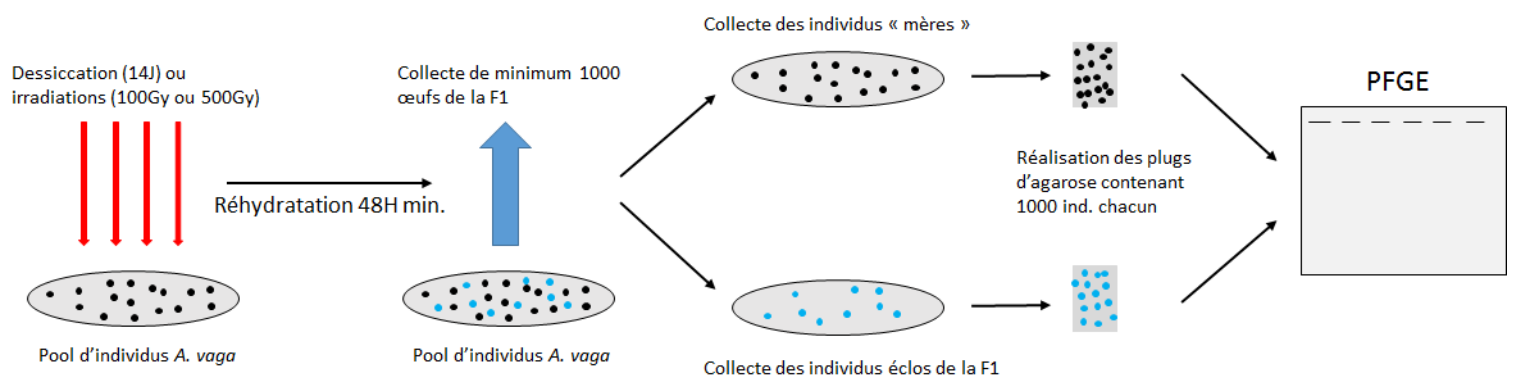


Figure 47 : Schéma expérimental de l'expérience ayant pour but de comparer la réparation de l'ADN au sein des cellules somatiques et des cellules germinales. Les individus desséchés/irradiés pondent à nouveau après environ 48H de réhydratation. Les points noirs représentent les individus « mères » desséchés ou irradiés et les points bleus représentent les descendants (F1) des individus « mères ». Les plugs (rectangles gris contenant les points noirs ou bleus) ne sont pas représentés à l'échelle, ainsi que le gel d'agarose réalisé pour la PFGE.

5.2. Étude de l'intégrité génomique des individus *A. vaga* par la méthode PFGE

5.2.1. Réparation de l'ADN au cours de la réhydratation

Dans ce mémoire, nous voulions voir si le génome des bdelloïdes desséchés était totalement réparé après un certain temps de réhydratation. En effet, les expériences réalisées par Hespeels *et al.*⁸ avaient montré que le génome des individus *A. vaga* contenait encore des DSBs après 48H de réhydratation/réparation. Nous avons donc réalisé la même expérience en réhydratant les individus pendant 7 jours, mais les résultats ont montré que le génome de nos bdelloïdes contenait toujours des DSBs et que la réparation de l'ADN n'avait pas fortement évolué entre les 48H et les 7J de réhydratation. Si les bdelloïdes sont capables de ré assembler une partie de leur génome, les résultats du présent mémoire suggèrent que les morceaux de chromosomes ne sont pas systématiquement ré assemblés aux tailles initiales. Dès lors, de nouvelles expériences sont nécessaires afin de mieux comprendre ce mécanisme de réparation et son impact sur des processus tels que la reproduction des bdelloïdes.

Premièrement, afin d'évaluer la réparation de l'ADN au sein d'individus desséchés/irradiés, il serait bien de refaire une expérience PFGE sur des individus *A. vaga* irradiés à 500Gy (afin d'avoir des résultats contrastés) et soumis à une cinétique de réparation (**Fig. 46**). Le temps de réhydratation maximum des individus serait supérieur à 7J puisque nos résultats nous ont montré que 7J de réhydratation ne suffisaient pas à réparer l'ADN de manière totale. Afin de tenter de maximiser nos chances d'observer une réparation totale du génome de nos individus, il serait même préférable de choisir un temps de réhydratation extrême. Il faudrait cependant ne pas dépasser un temps de 30 jours, afin d'éviter de n'avoir dans les cultures que la descendance F1 des individus desséchés au départ (nous avons vu dans le cycle de vie que nos individus *A. vaga* vivent en moyenne 30 jours au laboratoire). Cette expérience aura donc pour but d'évaluer la réparation de l'ADN au sein d'individus ayant été desséchés au préalable.

Dans un second temps, il serait intéressant de réaliser la même expérience sur la progéniture des individus desséchés/irradiés. Dans le cas où les bdelloïdes *A. vaga* desséchés/irradiés ne répareront jamais complètement leur ADN, cette expérience permettrait de voir si des DSBs sont toujours présentes au niveau de la descendance (ces individus proviennent des cellules germinales des individus « mères » ayant été soumises aux radiations/à la dessiccation également). Cela permettrait donc d'avoir une idée quant à l'éventuelle différence de réparation de l'ADN au sein des cellules somatiques et germinales. Pour pouvoir réaliser cette expérience, nous devons être sûrs de n'avoir que la F1 et donc les descendants directs des individus desséchés/irradiés. Pour cela (**Fig. 47**), nous irradierons (500Gy) des individus *A. vaga*, les réhydraterons et collecterons tous leurs œufs jusqu'à en avoir suffisamment pour pouvoir réaliser au moins un plug de 1000 individus par condition. Nous réaliserons ensuite d'un côté la collecte de tous les individus « mères » (desséchés/irradiés) et de l'autre, celle de tous les individus éclos de la F1 récoltée. Enfin, nous réaliserons des plugs pour ces deux conditions, nous ferons migrer l'ADN par la méthode PFGE et finalement nous visualiserons le gel et comparerons les résultats. Cela nous permettrait donc d'avoir une comparaison directe entre la réparation de l'ADN au sein des cellules somatiques et des cellules germinales. En effet, les individus « mères » représenteraient les cellules somatiques (en majorité), alors que les individus de la F1 représenteraient les cellules germinales des individus « mères ».

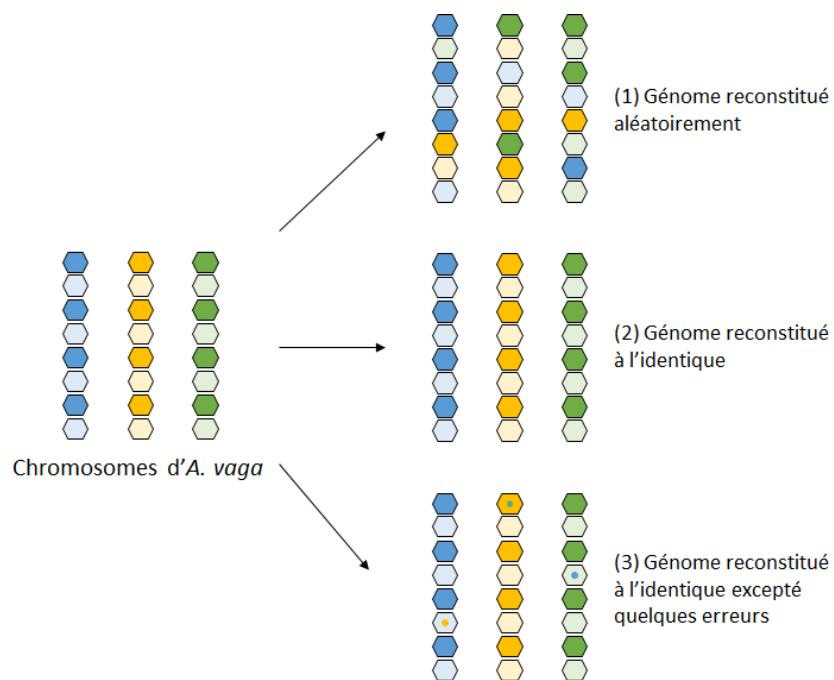


Figure 48 : Représentation schématique des différentes possibilités de réarrangement chromosomiques suite à la dessiccation/aux radiations chez *A. vaga*. Ici, seuls 3 chromosomes sont représentés mais les bdelloïdes *A. vaga* en possèdent 12.

L'inconvénient de cette méthode est qu'il faudrait récolter au minimum 1000 œufs à la main afin de pouvoir réaliser au moins un plug de 1000 individus.

5.2.2. Réassemblage du génome au cours de la réhydratation

La structure du génome des bdelloïdes *A. vaga* suggère que de nombreux réarrangements ont eu lieu au cours de l'évolution de ces organismes⁴⁸. En plus de ces réarrangements, il semblerait que les bdelloïdes « profitent » de l'état de leur génome durant la dessiccation pour acquérir des fragments d'ADN étranger^{35,38,50}. Environ 8 % des gènes des bdelloïdes *A. vaga* font partie de cet ADN étranger, ce qui est significativement supérieur comparé à la plupart des autres organismes^{38,47,48,50}. De ce fait, les bdelloïdes doivent être capables de gérer de tels remaniements et insertions au sein de leur génome. De plus, les expériences PFGE nous ont démontré l'existence d'un mécanisme de réparation de l'ADN actif au sein des bdelloïdes, lors de la réhydratation. Dès lors, nous pensons que les profonds réarrangements du génome des bdelloïdes *A. vaga* possèdent un lien avec la réparation de l'ADN.

Les bdelloïdes pourraient donc (1) tolérer que leur génome soit assemblé de différentes manières au cours des cycles de dessiccation/réhydratation ; (2) être capables de réassembler leur génome comme le génome de départ (avant dessiccation) ; (3) être capables de réassembler leur génome comme avant dessiccation, mais en tolérant quelques erreurs qui permettraient l'évolution des bdelloïdes sous pression de sélection (**Fig. 48**). Nous avons tenté de répondre à cette question en réalisant des expériences PFGE couplées à l'utilisation d'une enzyme de restriction. Cette dernière nous a permis d'observer un profil de restriction sur lequel nous nous sommes basés pour déterminer si le génome des individus *A. vaga* est réassemblé de la même manière que le modèle de départ ou non. Au vu des résultats obtenus au cours de ce mémoire, il semblerait qu'une partie au moins du génome des bdelloïdes soit réassemblé de la même manière que le génome avant dessiccation. Cependant, afin de confirmer ces résultats, il est indispensable de refaire ces expériences avec d'autres enzymes de restriction (générant d'autres gammes de tailles de fragments), afin de vérifier que le génome est réarrangé de la même manière au niveau de toutes les régions génomiques.

Il serait important également de mettre au point un autre protocole de séparation par la méthode PFGE dans le but de séparer des fragments plus grands. En effet, nos résultats PFGE nous ont souvent montré la présence d'un « gros spot noir » aux environ de 2200 Kb, là où la séparation des fragments n'est pas résolue. Cela nous permettrait de voir comment la dessiccation ou les radiations affectent les grands fragments d'ADN et comment ces derniers sont réparés. De plus, nous pourrions aussi analyser le profil de restriction de NotI au niveau des grands fragments d'ADN.

Cette étude du réassemblage du génome aurait cependant besoin d'être renforcée par d'autres méthodes plus précises. En effet, la méthode PFGE couplée à l'enzyme de restriction ne nous donne une information que sur la taille des fragments d'ADN générés par l'enzyme de restriction en condition hydratée, desséchée/irradiée et réhydratée. Ainsi, nous savons uniquement que, lors de la réhydratation, l'ADN est réparé de telle sorte que l'enzyme de restriction génère des fragments d'ADN de même taille que ceux générés en condition d'hydratation (génome non dégradé par la dessiccation/radiations). Néanmoins, des variations de structure génomique peuvent avoir eu lieu sans que cela ne soit détectable par l'analyse de la taille des fragments générés par une enzyme de restriction.

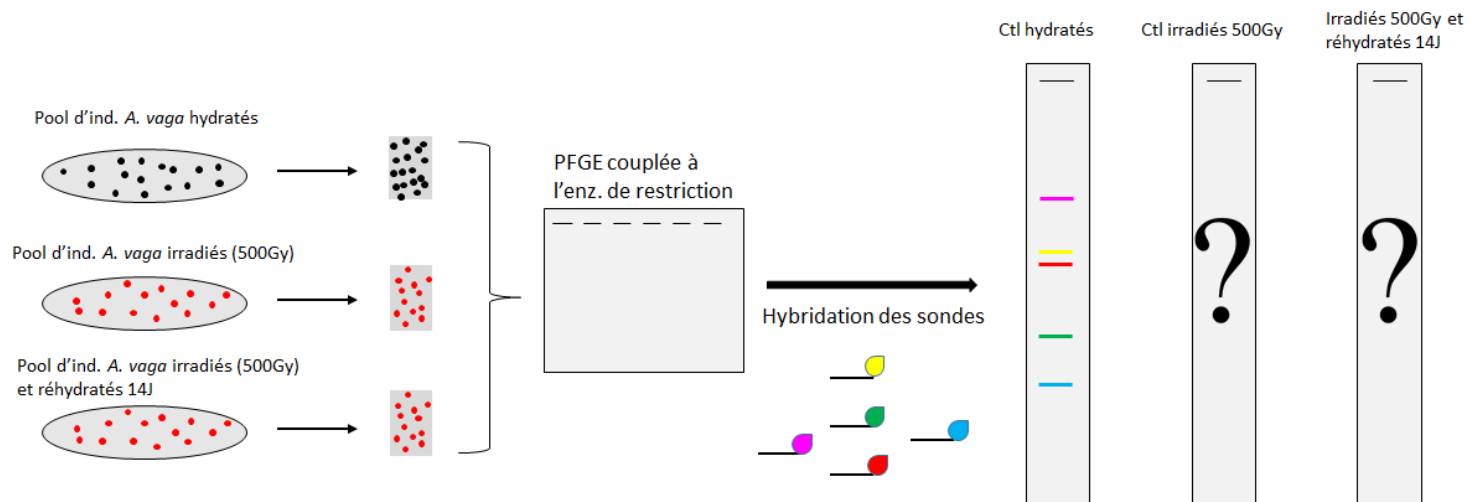


Figure 49 : Schéma expérimental de l'expérience visant à réaliser une *Gel In Situ Hybridization* afin d'étudier le réarrangement génomique après une dessiccation/irradiation. Les plugs de chaque condition sont réalisés, traités par l'enzyme de restriction Not1 et l'ADN migre dans un gel par PFGE. Ensuite, nous venons hybrider des sondes marquées par un fluorochrome, différent selon la séquence génomique, sur des régions connues de l'ADN présent dans le gel. Nous pouvons ensuite révéler les bandes fluorescentes et comparer les profils de bandes colorées obtenus chez les individus hydratés, irradiés et réhydratés 14J. Cela nous permettra de voir si une région connue d'ADN va se retrouver au même endroit dans le génome après un processus de réassemblage génomique suite à la fragmentation de l'ADN.

Nous pourrions donc refaire la même expérience en réalisant une « *Gel In Situ Hybridization* » (**Fig. 49**). Cela consiste à hybrider des sondes fluorescentes sur des régions spécifiques de l'ADN contenu dans le gel d'agarose après la migration par la méthode PFGE. Il faudrait s'arranger pour assigner une couleur de fluorescence à une région du génome lors de la création des sondes. Après hybridation des sondes au niveau de l'ADN des individus *A. vaga*, il faudrait ensuite révéler le gel (en fluorescence) afin de voir apparaître les spots de fluorescence de différente couleur selon les sondes créées. Il serait alors possible de comparer les patterns de chaque puits/chaque condition. Cela permettrait donc de vérifier que des régions d'ADN ont été réarrangées de la même manière chez des individus réhydratés que chez les individus hydratés.

Enfin, une autre expérience possible et qui est en cours de réalisation au laboratoire dans le cadre du Projet ARC⁸¹ est le séquençage de l'ADN d'un pool de clones *A. vaga* avant et après dessiccation ainsi qu'avant et après dessiccation suivie de radiations massives (protons). Une expérience de génomique comparative serait alors réalisée et consisterait à aligner les séquences génomiques obtenues pour chaque condition (avant/après) afin de détecter d'éventuelles variations d'organisation du génome des individus *A. vaga*.

5.3. Visualisation des cassures d'ADN chez des bdelloïdes *A. vaga* par la méthode du TUNEL

Au terme de nos expériences PFGE, nous nous sommes demandé si les cellules somatiques et les cellules germinales étaient traitées de la même manière par les DSBs ainsi que par la réparation de l'ADN. En effet, alors que nos individus *A. vaga* contenaient encore de nombreuses DSBs, nous observions qu'ils étaient déjà capables de se reproduire et de pondre des œufs viables. Nous avons donc pensé que soit l'ADN des cellules germinales était protégé de façon à réduire les dommages induits par les DSBs, soit l'ADN des cellules germinales est réparé prioritairement par rapport à l'ADN des cellules somatiques (ces cellules doivent encore subir des divisions de maturation⁷⁷), ce dernier ne se divisant plus (organismes eutéliques⁷⁷). Nous avons donc tenté de répondre à ces questions en appliquant la technique du TUNEL aux bdelloïdes *A. vaga* desséchés et soumis à une cinétique de réhydratation/réparation. Cette technique avait pour but de visualiser les cassures d'ADN en discriminant celles présentes dans les cellules somatiques et celles dans les cellules germinales. Un problème de perméabilisation de nos individus ne nous a pas permis d'obtenir les réponses que nous espérions. Il serait donc important de tenter de résoudre ce problème de perméabilisation, ou alors de tester des conditions de travail permettant une perméabilisation plus efficace. Par exemple, il serait intéressant de recommencer à travailler sur lames plutôt que sur coverslips étant donné que nos problèmes semblent avoir commencé lorsque nous sommes passés aux coverslips. Cependant, nous avons un problème de marquage hétérogène des individus *A. vaga* lorsque nous travaillons sur coverslips. Il faudrait alors trouver un moyen de délimiter une zone sur les lames (en gravant un carré par exemple) qui nous permettrait de savoir où déposer les réactifs afin de marquer l'ensemble des individus de la même manière.

Il serait également intéressant de refaire l'expérience TUNEL en utilisant un autre kit. Ce dernier est le kit Click-iT® TUNEL Alexa Fluor® 488 Imaging Assay (ThermoFisher Scientific) et serait plus performant que le kit TUNEL que nous avons utilisé jusqu'à présent. Les avantages de ce kit sont (1) les dUTPs utilisés sont modifiés avec un groupe alkyne qui permet aux nucléotides d'être incorporés plus rapidement par l'enzyme TdT comparé aux dUTPs couplés à la fluorescéine ; (2) la solution de labelling contient un réactif Alexa Fluor® azide (MW < 1000) qui est beaucoup plus petit qu'un anticorps (MW < 150 000) et peut donc traverser les membranes plus facilement. La perméabilisation membranaire des individus peut donc se permettre d'être moins agressive que ce que nous attendions dans notre protocole

TUNEL testé. Un premier test de ce nouveau kit réalisé sur coverslip n'a pas pu montrer une amélioration significative des résultats (Comm. Person. C. Demazy).

5.4. Impacts de la dessiccation sur le fitness des individus *A. vaga*

Un autre but de ce mémoire était d'observer les impacts éventuels de la dessiccation sur des individus *A. vaga* sénescents. En effet, après avoir observé que la plupart des individus isolés après réhydratation étaient de nouveau capables de pondre, nous avons pensé que la dessiccation pourrait réactiver le mécanisme de ponte chez des individus sénescents. Après avoir optimisé les expériences de dessiccation sur des individus isolés, les résultats de nos expériences ont montré que des individus sénescents desséchés 1J ne se remettaient pas à pondre lors de la réhydratation. Une possibilité éventuelle est que la dessiccation de 1J n'ait pas suffi à enclencher suffisamment le mécanisme de réparation des dommages oxydatifs (peut-être que le niveau d'antioxydants présents au sein des cellules des bdelloïdes était suffisant pour neutraliser complètement les ROS produits au cours de la dessiccation de 1J, ce qui n'a donc pas nécessité l'activation d'un mécanisme de réparation des dommages oxydatifs). Il faudrait donc refaire cette expérience en desséchant des individus sénescents pendant une durée plus longue. Cependant, nous avons également observé dans cette expérience que les individus sénescents étaient plus lents et moins réactifs, ce qui les empêchait probablement d'adopter une conformation de repliement idéale²⁵ lors de l'entrée en dessiccation. Ce défaut de repliement pourrait donc aussi être la cause des résultats négatifs observés (pas de reponte après dessiccation). En effet, le mauvais repliement des individus pourrait avoir altéré (mécaniquement) la structure corporelle permettant la ponte. Il faudrait donc trouver un moyen de permettre aux bdelloïdes sénescents d'adopter la conformation de repliement idéale, mais cela ne semble pas évident. Enfin, peut-être que la dessiccation ne réactive tout simplement pas la ponte chez les individus sénescents lors de la réhydratation. En effet, les bdelloïdes étant eutéliques⁷⁷, ils pourraient avoir pondu tous leurs ovocytes avant la dessiccation et ne plus en avoir de disponible. Il serait alors intéressant de réaliser une coloration au DAPI sur les individus sénescents afin de voir s'ils possèdent encore ou non des cellules germinales lorsqu'ils ont arrêté de pondre.

5.5. Effet protecteur du tréhalose contre les dommages oxydatifs

Lors de l'optimisation de la dessiccation sur des individus isolés, nous avons découvert que le tréhalose extracellulaire était capable de conférer une protection aux individus *A. vaga* puisque la survie après dessiccation était fortement augmentée. Cela confirme la capacité du tréhalose à conférer ou améliorer les capacités de résistance à la dessiccation chez différents organismes. Cela nous a amenés à nous demander si le tréhalose pourrait également protéger l'ADN contre les DSBs. Les résultats de l'expérience PFGE que nous avons réalisée ont montré que, effectivement, le tréhalose permettrait de réduire les DSBs induites à l'ADN lors de la dessiccation. Ces résultats nous ont amenés à émettre une hypothèse qui permettrait d'expliquer la raison pour laquelle les bdelloïdes ne produisent pas de tréhalose, ou alors très peu. Nous avons vu précédemment que les bdelloïdes auraient pu évoluer et ainsi perdurer jusqu'à aujourd'hui grâce aux multiples remaniements de leur génome (DSBs/réparation de l'ADN) au cours des cycles de dessiccation/réhydratation.

Si le tréhalose permet effectivement de réduire le niveau de DSBs induites lors de la dessiccation, et s'il était produit en quantités significatives chez les bdelloïdes, alors ce sucre non-réducteur pourrait freiner les remaniements du génome et donc l'évolution des bdelloïdes. Il faudrait cependant refaire cette expérience afin de confirmer que le tréhalose réduit bien le niveau de DSBs chez des individus *A. vaga* soumis à une dessiccation. De plus, nous pourrions réaliser la même expérience en augmentant le temps maximum de dessiccation (>33J) afin de voir si l'effet protecteur du tréhalose perdure plus longtemps ou non. Enfin, lorsque la technique du TUNEL sera optimisée pour obtenir des résultats sur nos bdelloïdes, nous pourrions également visualiser et comparer les cassures d'ADN chez des individus desséchés en présence ou non de tréhalose.

Le tréhalose permettrait de séquestrer les ROS générés lors de la dessiccation et ainsi de réduire les DSBs induites par ces derniers ⁶⁴. Les radiations par protons sont réalisées sur des individus *A. vaga* desséchés. Il n'y a donc pas de formation de ROS et les radiations vont directement générer des DSBs au niveau de l'ADN des bdelloïdes ⁸. Il serait donc intéressant de comparer le niveau de DSBs dans des individus *A. vaga* irradiés (protons) en présence ou non de tréhalose. Si une réduction du niveau de DSBs est observé chez les individus irradiés en présence de tréhalose par rapport aux individus irradiés en absence de tréhalose, alors cela signifierait que l'action protectrice du tréhalose ne s'exerce pas qu'au niveau des ROS (les protons ne génèrent pas de ROS).

Comme le tréhalose est supposé séquestrer les ROS, nous pourrions également comparer l'évolution du niveau de ROS (cf. 5.1) ainsi que des dommages oxydatifs (carbonylation protéique, mutations à l'ADN, peroxydation lipidique) chez des individus hydratés et des individus desséchés en présence ou non de tréhalose.

5.6. Rôle(s) du protéasome lors de la dessiccation

Dans ce mémoire, j'ai dû réfléchir à la manière d'optimiser la mise en dessiccation et la réhydratation des individus *A. vaga*. J'ai également étudié les impacts de la dessiccation/réhydratation sur l'ADN et contribué à l'étude des mécanismes impliqués dans la réparation des dommages à l'ADN. Dans mes réflexions, j'ai tenté d'envisager certaines voies jouant un rôle dans la résistance des bdelloïdes mais peu étudiées jusqu'à aujourd'hui.

Mes réflexions m'ont donc amenée à penser que le protéasome pourrait jouer un rôle important dans le phénomène de dessiccation, et plus particulièrement lors de la réhydratation. En effet, les expériences de Ricci ⁷⁵ ont montré que la dessiccation entraîne une amélioration du fitness des bdelloïdes réhydratés. J'ai alors pensé que cette augmentation de fitness pourrait être due à une réduction des dommages oxydatifs *via* un éventuel mécanisme de réparation des dommages oxydatifs générés par la dessiccation chez les bdelloïdes. Comme le protéasome joue un rôle dans la dégradation des protéines oxydées ⁸²⁻⁸⁴ et permettrait d'augmenter l'espérance de vie (*via* une augmentation de son activité) ⁸⁵, il pourrait avoir un rôle important lors de la dessiccation/réhydratation.

Durant ce mémoire, j'ai donc tenté de trouver des gènes candidats du protéasome chez *A. vaga*, qui pourraient être surexprimés lors de la dessiccation/réhydratation. Pour cela, j'ai cherché (UniProt) des séquences protéiques de sous-unités du protéasome connues chez d'autres organismes (*C. elegans*, *A. thaliana*, ...) et j'ai blasté ces séquences protéiques contre la base de données du génome d'*A. vaga* (BioEdit⁸⁶, E-value threshold of 10^{-10}). Cela avait pour but de tenter de trouver des gènes d'*A. vaga* contenant des séquences protéiques de sous-

unités du protéasome similaires à celles des autres organismes (**Fig. 50**). J'ai ensuite cherché les séquences protéiques des différents gènes candidats trouvés chez *A. vava* (Genoscope, *A. vava* Genome Browser) et j'ai blasté ces séquences protéiques contre une base de données universelle (NR NCBI). Les domaines conservés type PFAM ont également été recherché pour renforcer la caractérisation des gènes candidats impliqués dans la fonction du protéasome. Je devrai ensuite rechercher mes gènes candidats d'*A. vava* dans la liste des gènes d'*A. vava* constitutivement exprimés (Comm. Person. B. Hespeels) puis regarder si ces gènes candidats sont surexprimés ou non lors de la dessiccation et lors de la réhydratation (données RNAseq en cours d'analyse).

En parallèle avec cela, B. Hespeels a cherché les gènes impliqués dans la fonction du protéasome dans la base de données KEGG. Cette base de données nous a permis une visualisation graphique de l'expression constitutive des gènes du protéasome et leur éventuelle surexpression en condition de dessiccation ou de réhydratation (**Fig. 51**). La **Fig. 51** représente la structure des différents protéasomes, avec le nom de chaque sous-unité. Les rectangles à droite reprennent ces sous-unités/protéines et sont colorés suivant la condition d'expression du gène correspondant. Une coloration verte signifie que le gène est constitutivement exprimé, une coloration rouge signifie que le gène est surexprimé en condition de dessiccation, et une coloration bleue signifie que le gène est surexprimé en condition de réhydratation.

Il serait intéressant de comparer les résultats de cette base de données KEGG (annotation automatique) avec les résultats que j'ai obtenus *via* mes recherches bioinformatiques (annotation manuelle). En effet, la bioinformatique repose sur des statistiques et des résultats faux positifs sont possibles. Il est donc important de confirmer des résultats bioinformatiques par plusieurs approches différentes.

Enfin, il serait nécessaire de valider les prédictions de l'expression du protéasome basées sur des données RNAseq. Il faudrait donc réaliser une PCR quantitative en temps réel (qRT-PCR) sur des individus desséchés et des individus réhydratés afin de vérifier que les gènes candidats trouvés sont bien surexprimés dans la condition testée. De plus, la qRT-PCR nous permettrait de tester un plus grand nombre de conditions que celles testées par la méthode bioinformatique (Hydraté/Desséché/Réhydraté 1H30). Une autre possibilité serait de tester l'activité du protéasome *via* l'utilisation d'un *Proteasome Activity Assay Kit* (abcam®, ab107921). Ces expériences nous permettraient donc d'obtenir plus d'informations quant aux mécanismes moléculaires qui se mettent en place lors de la dessiccation/réhydratation chez les bdelloïdes.

6. Conclusion

Le but de ce mémoire était d'étudier différents impacts de la dessiccation chez le rotifère bdelloïde *A. vaga*. Comme nous l'avons vu au cours de ce mémoire, ces impacts se situent à plusieurs niveaux : les dommages oxydatifs sur les protéines, les dommages à l'ADN ainsi que les impacts sur le fitness des individus.

La première question de ce mémoire concernait l'évolution des dommages oxydatifs au cours de la dessiccation chez les bdelloïdes et ses impacts sur les individus. Nous voulions voir si l'accumulation des dommages oxydatifs était liée à la diminution de la survie des bdelloïdes lors d'une dessiccation prolongée. Par ailleurs, nous voulions tenter de mettre en évidence l'existence d'un mécanisme de réparation actif des dommages oxydatifs lors de la réhydratation. Nos expériences ne nous ont pas encore permis de répondre avec précision à ces questions. L'évaluation des dommages par OxiELISA n'a pas été reproductible. L'Oxyblot réalisé lors de ce mémoire suggère une augmentation de la carbonylation des protéines lors de l'entrée en dessiccation. Une nouvelle évaluation de ce phénomène par Oxyblot devrait être réalisée pour valider la reproductibilité de cette technique. D'autres techniques comme le DotBlot pourraient contribuer à améliorer nos connaissances quant à l'évaluation des dommages oxydatifs induits par la dessiccation et la réparation subséquente de ces derniers après réhydratation.

La deuxième question de ce mémoire concernait l'accumulation de dommages de l'ADN type cassures double brin (DSBs) ainsi que le réassemblage du génome après réhydratation. Les résultats de ce mémoire ont confirmé l'induction de « DSBs » suite à la dessiccation mais également via l'exposition à des doses croissantes de protons. Une diminution de ces dommages a également été observée après réhydratation des échantillons. Le but de ce mémoire était donc de voir si l'ADN des bdelloïdes pouvait être entièrement réparé ou si les bdelloïdes étaient capables de perdurer avec des fragments d'ADN non réassemblés, tout en récupérant un phénotype actif et une capacité de ponte. Le processus de réparation a été suivi sur une période de sept jours après réhydratation d'individus desséchés et éventuellement irradiés. Nos expériences ne nous ont pas permis d'observer une restauration complète du profil PFGE observé avant dessiccation. L'ensemble des dommages ne semblent donc pas être réparé. Cependant, le suivi d'un profil de restriction du génome avant et après réhydratation suggère la possibilité pour certains fragments d'être réparés de la même façon qu'initialement.

De plus, étant donné que les bdelloïdes sont capables de pondre des œufs viables alors même que leur génome contient encore des DSBs, nous nous sommes demandé si la réparation de l'ADN pouvait être « favorisée » dans les cellules germinales par rapport aux cellules somatiques. Les bdelloïdes étant des organismes eutéliques, ils pourraient ne pas avoir besoin de réparer entièrement l'ADN de leurs cellules somatiques, contrairement à celui de leurs cellules germinales. Nos expériences TUNEL ne nous ont pas encore permis de répondre à cette question. Des optimisations de la perméabilisation de nos échantillons devraient pouvoir solutionner les problèmes de marquage rencontrés dans ce travail.

En lien avec la réparation de l'ADN, nous voulions voir si le génome était réassemblé de la même manière qu'il l'était au préalable (avant dessiccation), ou s'il était réarrangé de manière « aléatoire », lors de la réparation de l'ADN. Nos expériences ont montré que l'enzyme de restriction NotI génère des fragments d'ADN de tailles similaires entre une population contrôle et sa descendance ayant subi un événement de dessiccation plus irradiation. Il semblerait donc que le génome de la descendance des bdelloïdes soit réarrangé selon un modèle de départ. L'utilisation d'autres enzymes de restrictions et le séquençage d'individus devrait contribuer à valider/invalider cette théorie.

La troisième question de ce mémoire concernait les impacts de la dessiccation sur le fitness des individus *A. vaga* sénescents. Des expériences de Ricci ont montré que la dessiccation augmente le fitness des bdelloïdes. Nous voulions donc voir s'il était possible que la dessiccation réactive le mécanisme de pontage chez des individus sénescents réhydratés. Après avoir réussi à optimiser la dessiccation sur des individus isolés, nos expériences ont montré que les bdelloïdes sénescents n'étaient pas capables de pondre à nouveau après avoir été desséchés. Des expériences supplémentaires sont nécessaires afin de vérifier si les individus sénescents possèdent toujours ou non des cellules germinales.

Dans l'expérience précédente, j'ai personnellement découvert que le tréhalose permettait d'améliorer la survie à la dessiccation chez des individus isolés. Nous avons alors pensé que le tréhalose pourrait également conférer une protection contre les dommages à l'ADN. Nos expériences ont montré que le tréhalose permettrait de réduire le niveau de DSBs générées au niveau de l'ADN lors de la dessiccation. En effet, le tréhalose serait capable de séquestrer les ROS à proximité du noyau, les empêchant ainsi d'aller générer des DSBs dans l'ADN des bdelloïdes. L'absence de tréhalose, améliorant la survie de ces organismes anhydrobiotiques, reste un mystère. Cette expérience nous a amenés à émettre l'hypothèse selon laquelle les bdelloïdes ne produisent pas de tréhalose car celui-ci réduirait les dommages à l'ADN jouant un rôle clef dans l'évolution de ces organismes.

Enfin, j'ai tenté lors de ce mémoire d'ouvrir de nouvelles voies d'études afin de tenter de comprendre en profondeur les mécanismes moléculaires responsables de la résistance à la dessiccation. Nous avons donc cherché des gènes du protéasome d'*A. vaga* qui pourraient être surexprimés en conditions de dessiccation, mais surtout en condition de réhydratation lorsque le métabolisme redémarre. Des expériences de PCR quantitative en temps réel sont cependant nécessaires afin de confirmer les résultats bioinformatiques.

7. Bibliographie

1. Tunnacliffe, A. & Lapinski, J. Resurrecting Van Leeuwenhoek's rotifers: a reappraisal of the role of disaccharides in anhydrobiosis. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **358**, 1755–71 (2003).
2. Keilin, D. The problem of anabiosis or latent life: history and current concept. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* **150**, 149–191 (1959).
3. Billi, D. & Potts, M. Life and death of dried prokaryotes. *Res. Microbiol.* **153**, 7–12 (2002).
4. Potts, M. Desiccation tolerance of prokaryotes. *Microbiol. Rev.* **58**, 755–805 (1994).
5. Crowe, J. H. *et al.* Anhydrobiosis: cellular adaptation to extreme dehydration. *Handb. Physiol. Physiol.* 1445–1477 (2011). doi:10.1002/cphy.cp130220
6. Bhat, A. H. *et al.* Oxidative stress, mitochondrial dysfunction and neurodegenerative diseases; a mechanistic insight. *Biomed. Pharmacother.* **74**, 101–110 (2015).
7. Gladyshev, E. & Meselson, M. Extreme resistance of bdelloid rotifers to ionizing radiation. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **105**, 5139–5144 (2008).
8. Hespeels, B. *et al.* Gateway to genetic exchange? DNA double-strand breaks in the bdelloid rotifer *Adineta vaga* submitted to desiccation. *J. Evol. Biol.* **27**, 1334–1345 (2014).
9. Potts, M. Mechanisms of desiccation tolerance in cyanobacteria. *Eur. J. Phycol.* **34**, 319–328 (1999).
10. Mattimore, V. & Battista, J. R. Radioresistance of *Deinococcus radiodurans*: Functions necessary to survive ionizing radiation are also necessary to survive prolonged desiccation. *J. Bacteriol.* **178**, 633–637 (1996).
11. Ingram, J. & Bartels, D. The Molecular Basis of Dehydration Tolerance in Plants. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **47**, 377–403 (1996).
12. Oliver, M. J., Tuba, Z. & Mishler, B. D. The evolution of vegetative desiccation tolerance in land plants. *Plant Ecol.* **151**, 85–100 (2000).
13. Alpert, P. Constraints of tolerance: why are desiccation-tolerant organisms so small or rare? *J. Exp. Biol.* **209**, 1575–1584 (2006).
14. Örstan, A. Desiccation survival of the eggs of the rotifer *Adleta vaga* (Davis, 1873). *Hydrobiologia* **313-314**, 373–375 (1995).
15. Ricci, C. Anhydrobiotic capabilities of bdelloid rotifers. *Hydrobiologia* **387/388**, 321–326 (1998).

16. Morano, K. A. Anhydrobiosis: Drying Out with Sugar. *Curr. Biol.* **24**, R1121–R1123 (2014).
17. Ferraguti, M. & Melone, G. Spermiogenesis in Seison nebaliae (Rotifera, Seisonidea): further evidence of a rotifer-acanthocephalan relationship. *Tissue Cell* **31**, 428–40 (1999).
18. Garey, J. R., Near, T. J., Nonnemacher, M. R. & Nadler, S. a. Molecular evidence for Acanthocephala as a subtaxon of Rotifera. *J. Mol. Evol.* **43**, 287–92 (1996).
19. Fontaneto, D. Rotifera Bdelloidea. *Systematics* 1–11 (2001). at http://www.atbi.eu/summerschool/files/summerschool/Fontaneto_Syllabus.pdf
20. Fontaneto, D., Westberg, M. & Hortal, J. Evidence of weak habitat specialisation in microscopic animals. *PLoS One* **6**, 1–7 (2011).
21. Ricci, C., Caprioli, M., Fontaneto, D. & Melone, G. Volume and Morphology Changes of a Bdelloid Rotifer Species (*Macrotrachela quadricornifera*) During Anhydrobiosis. *J. Morphol.* **269**, 233–239 (2008).
22. Ricci, C., Melone, G., Santo, N. & Caprioli, M. Morphological response of a bdelloid rotifer to desiccation. *J. Morphol.* **257**, 246–253 (2003).
23. Wharton, D. a. Water loss and morphological changes during desiccation of the anhydrobiotic nematode *Ditylenchus dipsaci*. *J. Exp. Biol.* **199**, 1085–93 (1996).
24. Shannon, a. J. The anhydrobiotic potential and molecular phylogenetics of species and strains of *Panagrolaimus* (Nematoda, Panagrolaimidae). *J. Exp. Biol.* **208**, 2433–2445 (2005).
25. Marotta, R., Leasi, F., Uggetti, A., Ricci, C. & Melone, G. Dry and survive: Morphological changes during anhydrobiosis in a bdelloid rotifer. *J. Struct. Biol.* **171**, 11–17 (2010).
26. Wright, J. C., Westh, P. & Ramlov, H. Cryptobiosis in tardigrada. *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* **67**, 1–29 (1992).
27. Higa, L. M. & Womersley, C. Z. New insights into the anhydrobiotic phenomenon: the effects of trehalose content and differential rates of evaporative water loss on the survival of *Aphelenchus* *J. Exp. Zool.* **129**, 120–129 (1993).
28. Ivarsson, H. & Jönsson, K. I. Aggregation effects on anhydrobiotic survival in the tardigrade *Richtersius coronifer*. *J. Exp. Zool.* **301A**, 195–199 (2004).
29. Wełnicz, W., Grohme, M. a., Kaczmarek, Ł., Schill, R. O. & Frohme, M. Anhydrobiosis in tardigrades—The last decade. *J. Insect Physiol.* **57**, 577–583 (2011).

30. França, M. B., Panek, a D. & Eleutherio, E. C. a. Oxidative stress and its effects during dehydration. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* **146**, 621–631 (2007).
31. Rizzo, A. M. *et al.* Antioxidant defences in hydrated and desiccated states of the tardigrade *Paramacrobiotus richtersi*. *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* **156**, 115–21 (2010).
32. Daly, M. J. A new perspective on radiation resistance based on *Deinococcus radiodurans*. *Nat. Rev. Microbiol.* **7**, 237–245 (2009).
33. Krisko, A. & Radman, M. Protein damage and death by radiation in *Escherichia coli* and *Deinococcus radiodurans*. ... *Natl. Acad. Sci.* **107**, 14373–14377 (2010).
34. Gusev, O. *et al.* Anhydrobiosis-Associated Nuclear DNA Damage and Repair in the Sleeping Chironomid: Linkage with Radioresistance. *PLoS One* **5**, e14008 (2010).
35. Fontaneto, D. & Barraclough, T. G. Do Species Exist in Asexuals? Theory and Evidence from Bdelloid Rotifers. *Integr. Comp. Biol.* 1–11 (2015). doi:10.1093/icb/icv024
36. Ricci, C. N. Ecology of bdelloids: how to be successful. *Hydrobiologia* **147**, 117–127 (1987).
37. Hsu, W. S. Oogenesis in the bdelloidea rotifer *Philodina roseola* (Ehrenberg). *La Cellule* **57**, 283–296 (1956).
38. Gladyshev, E. & Arkhipova, I. Genome structure of bdelloid rotifers: shaped by asexuality or desiccation? *J. Hered.* **101**, 85–93 (2010).
39. Gilbert, J. J. Population density, sexual reproduction and diapause in monogonont rotifers: New data for *Brachionus* and a review. *J. Limnol.* **63**, 32–36 (2004).
40. Gilbert, J. Dormancy in rotifers. *Trans. Am. Microsc. Soc.* **93**, 490–513 (1974).
41. Stelzer, C. P., Schmidt, J., Wiedlroither, A. & Riss, S. Loss of sexual reproduction and dwarfing in a small metazoan. *PLoS One* **5**, 1–6 (2010).
42. Snell, T. W. *et al.* A protein signal triggers sexual reproduction in *Brachionus plicatilis* (Rotifera). *Mar. Biol.* **149**, 763–773 (2006).
43. Poinar, G. O. & Ricci, C. Bdelloid rotifers in Dominican amber: Evidence for parthenogenetic continuity. *Experientia* **48**, 408–410 (1992).
44. Tang, C. Q., Obertegger, U., Fontaneto, D. & Barraclough, T. G. Sexual species are separated by larger genetic gaps than asexual species in rotifers. *Evolution (N. Y.)*. 2901–2916 (2014). doi:10.1111/evo.12483

45. Van Doninck, K., Schön, I. & Martens, K. A perspective on the importance of reproductive mode in astrobiology. *Astrobiology* **3**, 657–71 (2003).
46. Donald A. Levin. Pest Pressure and Recombination Systems in Plants. *Am. Nat.* **109**, 437–451 (1975).
47. Hespeels, B., Flot, J.-F., Derzelle, A. & Van Doninck, K. in *Evolutionary Biology: Genome Evolution, Speciation, Coevolution and Origin of Life* (ed. Pontarotti, P.) 207–225 (Springer International Publishing, 2014). doi:10.1007/978-3-319-07623-2
48. Flot, J.-F. *et al.* Genomic evidence for ameiotic evolution in the bdelloid rotifer *Adineta vaga*. *Nature* **500**, 453–457 (2013).
49. Mark Welch, D. B., Mark Welch, J. L. & Meselson, M. Evidence for degenerate tetraploidy in bdelloid rotifers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 5145–5149 (2008).
50. Eyres, I. *et al.* Horizontal gene transfer in bdelloid rotifers is ancient, ongoing and more frequent in species from desiccating habitats. *BMC Biol.* **13**, 90 (2015).
51. Boschetti, C. *et al.* Biochemical Diversification through Foreign Gene Expression in Bdelloid Rotifers. *PLoS Genet.* **8**, (2012).
52. Judson, O. P. & Normark, B. B. Ancient asexual scandals. *Trends Ecol. Evol.* **11**, 41–46 (1996).
53. Fischer, C., Ahlrichs, W. H., Buma, A. G. J., van de Poll, W. H. & Bininda-Emonds, O. R. P. How does the ‘ancient’ asexual *Philodina roseola* (Rotifera: Bdelloidea) handle potential UVB-induced mutations? *J. Exp. Biol.* **216**, 3090–5 (2013).
54. Loo, D. T. DNA Damage Detection In Situ, Ex Vivo, and In Vivo. *Methods* **682**, 3–13 (2011).
55. Daly, M. J. *et al.* Protein oxidation implicated as the primary determinant of bacterial radioresistance. *PLoS Biol.* **5**, 769–779 (2007).
56. Krisko, A., Leroy, M., Radman, M. & Meselson, M. Extreme anti-oxidant protection against ionizing radiation in bdelloid rotifers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 2354–7 (2012).
57. Strom, A. R. Osmoregulation in the model organism *Escherichia coli*: genes governing the synthesis of glycine betaine and trehalose and their use in metabolic engineering of stress tolerance. 437–445 (1998).
58. HersHKovitz, N., Oren, a. & Cohen, Y. Accumulation of trehalose and sucrose in cyanobacteria exposed to matric water stress. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**, 645–648 (1991).

59. Wright, J. C. Cryptobiosis 300 Years on from van Leuwenhoek: What Have We Learned about Tardigrades? *Zool. Anzeiger - A J. Comp. Zool.* **240**, 563–582 (2001).
60. Crowe, J. H. Trehalose As a "Chemical Chaperone": (2007).
61. Sun, W. Q. & Leopold, a. C. Cytoplasmic vitrification and survival of anhydrobiotic organisms. *Comp. Biochem. Physiol. - A Physiol.* **117**, 327–333 (1997).
62. Crowe, J. H., Carpenter, J. F. & Crowe, L. M. The role of vitrification in anhydrobiosis. *Annu. Rev. Physiol.* **60**, 73–103 (1998).
63. Benaroudj, N., Lee, D. H. & Goldberg, a. L. Trehalose Accumulation during Cellular Stress Protects Cells and Cellular Proteins from Damage by Oxygen Radicals. *J. Biol. Chem.* **276**, 24261–24267 (2001).
64. Yoshinaga, K. *et al.* Protection by trehalose of DNA from radiation damage. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **61**, 160–161 (1997).
65. Lapinski, J. & Tunnacliffe, A. Anhydrobiosis without trehalose in bdelloid rotifers. *FEBS Lett.* **553**, 387–390 (2003).
66. Blázquez, M. a. *et al.* Isolation and molecular characterization of the arabidopsis TPS1 gene, encoding trehalose-6-phosphate synthase. *Plant J.* **13**, 685–689 (1998).
67. Vogel, G., Aeschbacher, R. a., Müller, J., Boller, T. & Wiemken, A. Trehalose-6-phosphate phosphatases from Arabidopsis thaliana: Identification by functional complementation of the yeast tps2 mutant. *Plant J.* **13**, 673–683 (1998).
68. Hespeels, B. *et al.* Against All Odds: Trehalose-6-Phosphate Synthase and Trehalase Genes in the Bdelloid Rotifer Adineta vaga Were Acquired by Horizontal Gene Transfer and Are Upregulated during Desiccation. *PLoS One* **10**, e0131313 (2015).
69. Caprioli, M. & Ricci, C. Recipes for successful anhydrobiosis in bdelloid rotifers. *Hydrobiologia* **446-447**, 13–17 (2001).
70. Ricci, C., Caprioli, M. & Santo, N. Feeding and anhydrobiosis in bdelloid rotifers: a preparatory study for an experiment aboard the International Space Station. *Invertebr. Biol.* **123**, 283–288 (2005).
71. Jacobs, M. H. The effects of desiccation on the rotifer Philodina roseola. *J. Exp. Zool.* **6**, 207–263 (1909).
72. Ricci, C. & Covino, C. Anhydrobiosis of Adineta ricciae: Costs and benefits. *Hydrobiologia* **546**, 307–314 (2005).
73. Ricci, C. & Pagani, M. Desiccation of Panagrolaimus rigidus (Nematoda): survival, reproduction and the influence on the internal clock. *Hydrobiologia* **347**, 1–13 (1997).

74. Ricci, C. Life histories of some species of Rotifera Bdelloidea. *Hydrobiologia* **104**, 175–180 (1983).
75. Ricci, C., Caprioli, M. & Fontaneto, D. Stress and fitness in parthenogens: is dormancy a key feature for bdelloid rotifers? *BMC Evol. Biol.* **7 Suppl 2**, S9 (2007).
76. Slade, D., Lindner, A. B., Paul, G. & Radman, M. Recombination and replication in DNA repair of heavily irradiated *Deinococcus radiodurans*. *Cell* **136**, 1044–55 (2009).
77. Pagani, M., Ricci, C. & Redi, C. A. Oogenesis in *Macrotrachela quadricornifera* (Rotifera, Bdelloidea). *Hydrobiologia* **255-256**, 225–230 (1993).
78. Croft, D. P., Brent, L. J. N., Franks, D. W. & Cant, M. a. The evolution of prolonged life after reproduction. *Trends Ecol. Evol.* 1–10 (2015). doi:10.1016/j.tree.2015.04.011
79. Rebecchi, L. Dry up and survive: The role of antioxidant defences in anhydrobiotic organisms. *J. Limnol.* **72**, 62–72 (2013).
80. Giammarioli, S., Filesi, C. & Sanzini, E. Oxidative stress markers: specificity and measurement techniques. *Annali dell'Istituto Superiore di Sanità* **35**, 563–576 (1999).
81. ARC proposal: Bdelloid Rotifers : ‘another Gift from Nature’? (Acronym: vIRGIN) 1. 1–72
82. Pickering, Andrew M., Davies, K. J. a. Differential Roles of Proteasome and Immunoproteasome Regulators Pa28aB, Pa28y and Pa200 in the Degradation of Oxidized Proteins. *Arch Biochem Biophys* **523**, 181–190 (2013).
83. Höhn, T. J. A. & Grune, T. The proteasome and the degradation of oxidized proteins: Part III-Redox regulation of the proteasomal system. *Redox Biol.* **2**, 388–394 (2014).
84. Aiken, C. T., Kaake, R. M., Wang, X. & Huang, L. Oxidative stress-mediated regulation of proteasome complexes. *Mol. Cell. Proteomics* **10**, R110.006924 (2011).
85. Chondrogianni, N., Georgila, K., Kourtis, N., Tavernarakis, N. & Gonos, E. S. 20S proteasome activation promotes life span extension and resistance to proteotoxicity in *Caenorhabditis elegans*. *FASEB J.* **29**, 611–622 (2015).
86. Hall, T. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* **41**, 95–98 (1999).

Bibliographie non numérotée

Donner, J. (1965) Ordnung Bdelloidea. Berlin: Springer Verlag.

Eshel, I. (1991) Game theory and population dynamics in complex genetical systems: the role of sex in short-term and in long-term evolution. In *Game and Equilibrium Models I*, edited by R. Selten, Springer-Verlag, New York, pp. 6-28.

Fontana, F. 1767 *Ricerche fisica sopra il veleno della vipere*. Italy: Lucca.

Senaratna, T., McKersie, B.D., Borochoy, A., 1987. Desiccation and free radical mediated changes in plant membranes. J. Exp. Bot. 38, 2005-2014.

Van Valen, L.M. (1973) A new evolutionary law. *Evol. Theory* 1, 130.